

CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN
ÜBER PROSTAGLANDINSYNTASE-INHIBITOREN
VON ARZNEIPFLANZEN

MICHAEL WIERER

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0049

Chemische und biologische in-vitro-Untersuchungen
über Prostaglandinsynthase-Inhibitoren
von Arzneipflanzen

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Michael Wierer
aus München

Januar 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth
- Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1988

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
<u>1</u> DROGEN MIT ANTIPHLOGISTISCHER WIRKUNG	2
1.1 Entzündliche Erkrankungen	2
1.2 Bedeutung der Arachidonsäuremetaboliten für die Entzündung	4
1.3 Entzündungshemmende Arzneistoffe	7
1.3.1 Übersicht über die wichtigsten synthetischen Hemmstoffe der Prostaglandinbiosynthese	8
1.3.2 Pflanzliche Substanzen mit Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese	9
<u>2</u> SUCHE NACH NEUEN POTENTIELLEN PFLANZLICHEN ANTIPHLOGISTIKA	13
2.1 Gründe für ein Pflanzenscreening	13
2.2 Verwendete pharmakologische in-vitro-Screeningmethoden	13
2.3 Prostaglandinbiosynthese in Schafsamenblasenmikrosomen	15
2.3.1 HPLC-Bestimmung der Arachidonsäuremetaboliten = Prostaglandinsynthesetest	15
2.3.2 Erfassung der Cyclooxygenaseaktivität über Messung der initialen O ₂ -Einbaurate = Cyclooxygenasetest	19
2.4 Arachidonsäuremetabolismus in Humanthrombozyten	19
2.4.1 HPLC-Methode zur Trennung und Identifizierung der Metaboliten	20
2.4.2 Thromboxanbestimmung durch Radioimmunoassay	23
2.5 5-Lipoxygenaseweg in PMNL	23
<u>3</u> OPTIMIERUNG UND MODIFIZIERUNG DES PG-SYNTHESE-TESTES	24
3.1 Substratkonzentration	25
3.2 Einfluß von Cofaktoren	29
3.3 Enzympräparation und sonstige Versuchsbedingungen	35

<u>4</u>	AUSWAHL DER DROGEN UND INHALTSSTOFFE FÜR EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
4.1	In Volks-, Erfahrungsmedizin und Homöopathie verwendete Drogen	37
4.2	"Rheuma"-Präparate, die pflanzliche Extrakte oder etherische Öle enthalten	41
<u>5</u>	SCREENING VERSCHIEDENER INHALTSSTOFFGRUPPEN	42
5.1	Phenolische Verbindungen	42
5.2	Etherische Öle und deren Inhaltsstoffe	44
5.3	Scharfstoffe und Irritantien	48
5.4	Sesquiterpenlactone	49
5.5	Salicylsäure und ihre Derivate	50
5.5.1	Salixinhaltsstoffe	50
5.5.2	Weitere Salicylsäurederivate	52
5.6	Inhaltsstoffe von <i>Allium sativum</i>	53
5.7	Cucurbitacine und Naphthochinone	57
<u>6</u>	PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTER- SUCHUNGEN VON <i>LEDUM PALUSTRE</i> L.	58
6.1	Allgemeine Übersicht	58
6.1.1	Systematik und Verbreitung	58
6.1.2	Botanische Beschreibung	59
6.1.3	Verwendung und Pharmakologie	59
6.1.4	Bekannte Inhaltsstoffe	60
6.2	Eigene Untersuchungen	61
6.2.1	Untersuchungen mit dem etherischen Öl	61
6.2.1.1	Fraktionierung und Test	61
6.2.1.2	Identifizierung der wirksamen Komponente	62
6.2.1.3	Einfluß von Carvacrol auf die Thrombozyten- cyclooxygenase	66
6.2.2	Untersuchung des MeOH-Extraktes	69
6.2.2.1	Phytochemisches Screening	69
6.2.2.2	Identifizierung von Zone A (Esculin)	70
6.2.2.3	Isolierung von Zone B	71
6.2.2.4	Strukturaufklärung von Substanz B	71
6.2.2.4.1	UV- und IR-Spektroskopie	71
6.2.2.4.2	FAB- und EI-Massenspektroskopie	73

6.2.2.4.3	^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie	73
6.2.2.5	Isolierung von Zone N	78
6.2.2.6	Strukturaufklärung von Zone N	78
6.2.2.6.1	DC-Laufverhalten, UV- und IR-Spektroskopie	78
6.2.2.6.2	Massenspektroskopie	80
6.2.2.6.3	^1H -NMR-Spektroskopie	80
6.2.2.6.4	^{13}C -NMR-Spektroskopie	83
6.2.3	Pharmakologische Untersuchungen von Cumarinen	88
6.2.3.1	Kenntnisstand	88
6.2.3.2	Cyclooxygenaseweg in Schafsamenblasenmikrosomen	88
6.2.3.3	Arachidonsäuremetabolismus in Thrombozyten und PMNL	91
6.2.4	Diskussion der in Kap. 6.2 erhaltenen Ergebnisse	93
<u>7</u>	PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON TOXICODENDRON RADICANS (L.) KUNTZE	95
7.1	Allgemeine Übersicht	95
7.1.1	Systematik und Verbreitung	95
7.1.2	Botanische Beschreibung	95
7.1.3	Verwendung	97
7.1.4	Rhus-Allergien	97
7.1.5	Bisher bekannte Inhaltsstoffe	97
7.2	Eigene Untersuchungen	98
7.2.1	Pharmakologisches Screening und Fraktionierung	98
7.2.2	Untersuchung der CHCl_3 -Fraktion	99
7.2.2.1	Dünnschichtchromatographie	99
7.2.2.2	HPLC-Untersuchungen	100
7.2.2.3	Pharmakologische Untersuchungen der Hauptinhaltsstoffe	107
7.2.2.4	Urushiol-Gehaltsbestimmung und Standardisierungsversuche für den Extrakt	109
7.2.3	Untersuchungen der EtOAc- und n-BuOH-Fraktion	111
7.2.3.1	Identifizierung der Flavonolglykoside	111
7.2.3.2	Identifizierung der weiteren Gallussäureester und HPLC-Fingerprintanalyse	113
7.2.4	Screeninguntersuchung von Gerbstoffen im Prostaglandinsynthesetest	118
7.2.5	Diskussion der in Kap.7.2 erhaltenen Ergebnisse	121

8	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	122
8.1	Der Prostaglandinsynthesetest als Screening- methode	122
8.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen	122
8.3	Zum Mechanismus der Hemmungen	123
8.4	Ausblick für die Therapieanwendung	124
	Z U S A M M E N F A S S U N G	126
	E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	130
I	Herkunft der Drogen, Extrakte und Vergleichs- substanzen	130
1.	Ledum palustre	130
2.	Toxicodendron radicans	130
3.	Extrakte, etherische Öle und Reinsubstanzen für pharmakologische Screeninguntersuchungen	131
II	Allgemeine Arbeitsmethoden	133
1.	Dünnschichtchromatographie	133
2.	Säulenchromatographie	135
3.	Mitteldruck-Säulenchromatographie (MPLC)	136
4.	Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)	136
5.	Gaschromatographie (GC)	138
6.	Spektroskopische und physikalische Methoden	139
III	Spezielle Arbeitsmethoden	140
1.	Phytochemische Untersuchungen v. Ledum palustre	140
	Physikalische Daten	144
2.	Phytochemische Untersuchungen von Toxicodendron radicans	147
	Physikalische Daten	148
IV	Pharmakologische Untersuchungen	151
1.	Prostaglandinsynthesetest	151
2.	Cyclooxygenasetest	152
3.	Cooxidationsuntersuchungen	153
4.	Arachidonsäuremetabolismus in Thrombozyten	154
5.	Thromboxanbestimmung durch Radioimmunoassay	155
6.	5-Lipoxygenasetest	155
7.	Chemilumineszenz-Test auf Radikalfängereigen- schaften	155
	A N H A N G: Abkürzungsverzeichnis	156
	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	157

Einleitung

Seit der Einführung des "Naturstoffes" Salicylsäure und seines Folgeprodukts Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]) in die Therapie entzündlicher bzw. rheumatischer Erkrankungen hat kein weiterer Naturstoff mit gleichem oder ähnlichem Wirkprofil Eingang in die Therapie gefunden. Dies ist verwunderlich, wenn man bedenkt, daß der Arzneischatz vieler Länder über eine große Zahl von Drogen mit diesem Indikationsanspruch verfügt. Eine im Jahr 1980 durchgeführte Literaturrecherche ergab nicht weniger als 600 Zitierungen, wobei allerdings nicht immer klar zu unterscheiden war, welchen Drogen mehr allgemein antiphlogistische bzw. bevorzugt antirheumatische, antiarthrotische oder antiallergische Wirksamkeiten zuzuordnen waren. Ursache für diese Diskrepanz zwischen Zahl der verfügbaren und in der westlichen pharmazeutischen Industrie voll genutzten Drogen dürfte in dem Umstand zu sehen sein, daß es bis vor kurzem wenig brauchbare in-vitro-Modelle gab, um hiermit ein umfangreiches Screening durchzuführen und nach potentiellen Arzneidrogen zu suchen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen ersten Versuch zu unternehmen, um mit Hilfe des in-vitro-Prostaglandinsynthesemodells Extrakte und früher bereits aus diesen isolierte Pflanzenstoffe auf deren Fähigkeit zu untersuchen, dieses wichtige Enzymkompartiment innerhalb der Prostaglandinbiosynthesekette zu hemmen.

Soweit möglich, sollte außerdem bei guten Hemmstoffen versucht werden, den Wirkmechanismus genauer aufzuklären. Durch ergänzende Untersuchungen in anderen Testmodellen (der Arachidonsäurekaskade) sollten zusätzliche Informationen über die pharmakologischen Eigenschaften dieser Hemmstoffe erhalten werden.

Außerdem war es das Ziel, einige bekannte pflanzliche "Antirheumatika" mit guter Wirkung in diesem Testsystem phytochemisch mehr im Detail zu untersuchen.

ALLGEMEINER TEIL

1 Drogen mit antiphlogistischer Wirkung

1.1 Entzündliche Erkrankungen

Im Lehrbuch der Pathologie von EDER und GEDIGK (1) wird die Entzündung definiert als "die Summe der morphologischen und biochemischen Reaktionen des Gefäßbindegewebes, die durch verschiedenartige Schädlichkeiten ausgelöst werden". Zu den schädigenden Einflüssen, die eine solche Reaktion des Organismus auslösen können, gehören belebte Organismen (Bakterien, Viren u. a. Mikroorganismen), Allergene, physikalische Reize (Temperatur, Strahlung, mechan. Schädigung), chemische Reize und Fremdkörper. Dabei beobachtet man fünf klassische Entzündungssymptome:

Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Überwärmung (Calor), Schmerz (Dolor) und gestörte Funktion (Functio laesa).

Nach einer anfänglichen Gefäßkonstriktion folgt eine langanhaltende Vasodilatation. Infolge einer gesteigerten Gefäßpermeabilität tritt Blutplasma in den extravasalen Raum aus (Exsudation). Die Emigration von Blutzellen (PMNL, Monozyten, Lymphozyten und Plasmazellen) in das umliegende Gewebe führt zu einer Reihe von Immunreaktionen, zu denen u.a eine gesteigerte Phagozytose zählt. Ausgetretenes Fibrinogen setzt durch Fibrinbildung und Fibroblastenvermehrung einen proliferativen Prozeß des ortsständigen Bindegewebes in Gang.

Nach dem zeitlichen Ablauf oder der Einwirkungszeit der Noxe unterscheidet man zwischen der akuten Entzündung einerseits, bei der hämodynamische Veränderungen, Exsudation und Emigration im Vordergrund stehen und der chronischen Entzündung andererseits, bei der im allgemeinen die oben genannten Kardinalsymptome nicht so deutlich hervortreten und proliferative Prozesse im Vordergrund stehen. Die chronische Entzündung kann die Folge einer akuten Entzündung sein oder sich schleichend entwickeln [prim. chron. Entzündung](1,2).

Über die Beteiligung von Arachidonsäuremetaboliten an den Entzündungsvorgängen informiert Kap. 1-2.

Ein Teil des Rheumatischen Formenkreises zählt ebenfalls zu den entzündlichen Erkrankungen (2).

Hierzu gehören:

Akutes Rheumatische Fieber (Akuter Gelenkrheumatismus)

Rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritits)

Psoriasis-Arthritis

Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew)

Kollagenosen

Postinfektiöse Arthritiden

Von diesen kommt der Rheumatoiden Arthritis die größte Bedeutung zu, da sie etwa 2-5% der Bevölkerung befällt.

Nach schleichendem Beginn entsteht in den Gelenken eine chronische Entzündung der Synovialis, die zur Bildung eines zottenförmigen Granulationsgewebes (Pannus) führt, welches seinerseits den Gelenkknorpel und die Knochen angreift. Als Ursachen dieser Autoimmunerkrankung werden das Zusammentreffen genetischer Disposition und eines infektiösen Agens diskutiert. Die Noxe führt zu entzündlichen Reaktionen und Zellschädigungen. Freigesetzte Antigene lösen neben einer zellulären Immunantwort auch die Bildung von Antikörpern (Rheumafaktoren) gegen körpereigenes IgG aus. Unter Beteiligung von Komplement reagieren diese mit dem IgG zu Immunkomplexen, die von Granulozyten und den Randzellen der Synovia phagozytiert werden. Hierdurch werden lysosomale Enzyme freigesetzt und es kommt zu einer Proliferation der Synovialzellen. Damit wird die entzündliche Reaktion nebst Zellschädigung erneut in Gang gesetzt (1,2).



1.2. Bedeutung der Arachidonsäuremetaboliten für die Entzündung

Für die Entstehung und den Verlauf von Entzündungen spielen neben Histamin, Bradykinin, Lymphokinen, Interleukin I und Komplementfaktoren insbesondere die Eicosanoide der Arachidonsäurekaskade eine wichtige Rolle.

Arachidonsäure liegt in den Phospholipiden gebunden vor. Veränderung oder Zerstörung von Membranstrukturen durch Trauma oder Entzündung führen über eine Aktivierung von Phospholipasen (A_2 oder C) zu einer Erhöhung der Konzentration an freier Arachidonsäure. Je nach Enzymmuster der betreffenden Zelle wird die Arachidonsäure in eine Reihe von hochaktiven Metaboliten umgewandelt (Abb. 1):

über den Cyclooxygenaseweg entstehen über die instabilen cyclischen Endoperoxide $PGG_2^*)$ und PGH_2 die stabileren Prostaglandine PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$ sowie Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxan A_2 .

Auf dem 5-Lipoxygenaseweg entstehen neben 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) das Leukotrien B_4 , das neben ausgesprochen chemotaktischen auch entzündungsfördernde Eigenschaften aufweist. Die ebenfalls aus 5-HPETE gebildeten Peptidoleukotriene LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 und LTF_4 spielen bei der Auslösung allergischer Reaktionen und des Asthmaanfalls eine entscheidende Rolle.

*) vgl. Abkürzungsverzeichnis S. 156

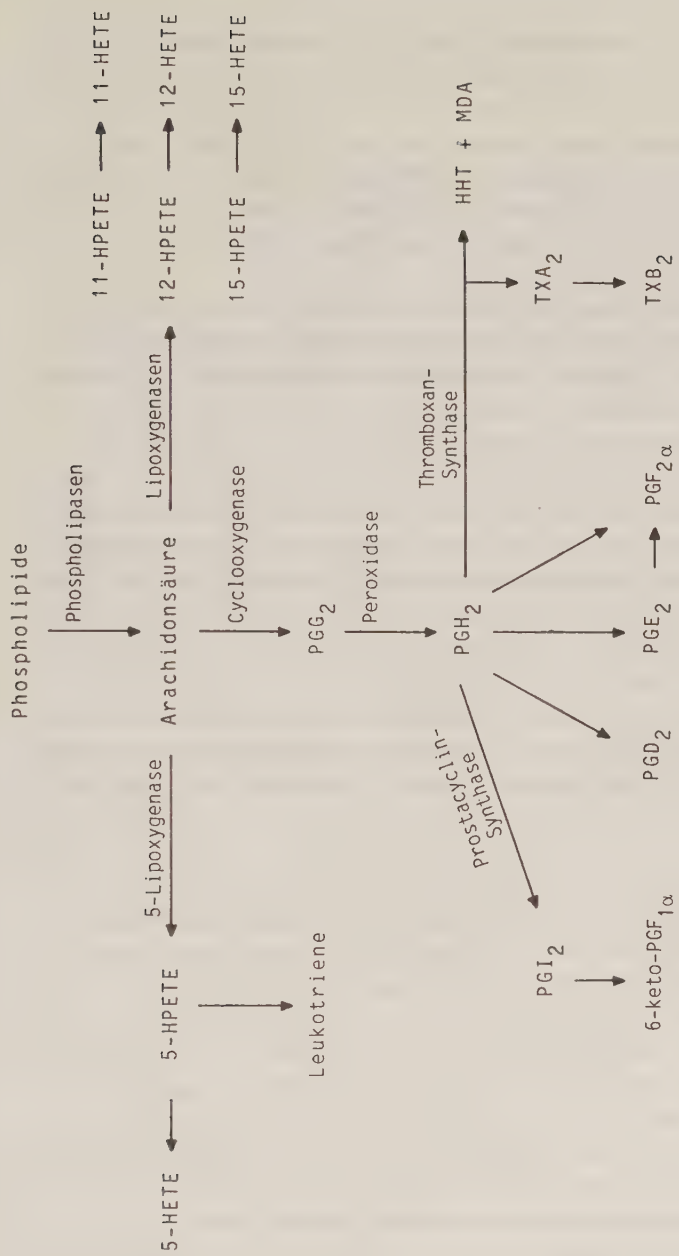


Abb. 1: Stoffwechselwege der Arachidonsäure

Die Rolle der Eicosanoide im entzündlichen Geschehen
[nach SCHRÖR (3) und KIRCKPATRICK et al. (4)*]]:

a) Vasodilatation: PGE_1 , PGE_2 , PGD_2 und PGI_2 können eine Gefäßdilatation hervorrufen. Erythembildung (Rubor) und Überwärmung (Calor) des entzündeten Gebietes haben hierin ihre Ursache. Am Auftreten von Fieber soll PGE_2 beteiligt sein.

b) Gefäßpermeabilität: Die vasodilatierenden PGE_1 , PGE_2 und PGI_2 scheinen die Wirkung anderer permeabilitätssteigernder Mediatoren wie Histamin, Bradykinin und Leukotriene zu potenzieren. Auch 5-HETE und 12-HETE sowie PGG_2 bewirken eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität.

c) Schmerz: Während PGE_2 und PGI_2 erst bei höherer Dosierung direkt Schmerzen hervorrufen, sensibilisieren sie bereits im Nanogramm-Bereich die Schmerzrezeptoren gegenüber der schmerz-erzeugenden Wirkung anderer Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Bradykinin und Histamin.

d) Chemotaxis: Die stärkste chemotaktische Wirkung auf Granulozyten geht vom LTB_4 aus. Neben den Lipoxygenaseprodukten 12-HETE und 5-HETE wirkt auch das Cyclooxygenaseprodukt HHT chemotaktisch (5).

Die am Entzündungsort angehäuften Makrophagen und Granulozyten setzen bei der Phagozytose weitere Eicosanoide, lysosomale Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies frei und tragen somit zur Gewebsschädigung mit nachfolgender Funktionsstörung (functio laesa) bei.

Die Anwesenheit der Eicosanoide bei der experimentell erzeugten akuten Entzündung und die gleichzeitige Reduktion der Eicosanoidkonzentration und der Entzündungssymptome durch Gabe nichtsteroidaler Antiphlogistika belegen die eindeutig proin-

*) hier findet sich eine umfangreiche Zusammenstellung
der Originalliteratur

flammatorische Mediatorrolle der Eicosanoide in der akuten Phase einer Entzündung. Ihre Rolle im chronischen Krankheitsverlauf scheint wesentlich komplexer zu sein und ist nach wie vor Gegenstand zahlreicher Untersuchungen:

In zahlreichen Arbeiten (4,6,7,8) wurden sowohl in Synovialflüssigkeit als auch in Synovizyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis deutlich erhöhte Spiegel von Cyclooxygenaseprodukten (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , TXB_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) sowie LTB_4 und 5-HETE festgestellt. Durch Gabe von NSAIDs konnten diese reduziert werden. Weiterhin wurde die Beteiligung der Prostaglandine an Knorpel- und Knochendestruktionen in vitro und in vivo nachgewiesen (4). Andererseits spielen bei den proliferativen Prozessen in der chronischen Phase einer Entzündung zusätzlich ausgesprochen immunologische Reaktionen eine äußerst wichtige Rolle. Da die Prostaglandine u.a. die Aktivität von B- und T-Lymphozyten sowie die Makrophagenaktivität beeinflussen können (9), wirken sie auch modulierend auf den Entzündungsverlauf, wobei es letztendlich auch zur Hemmung von proliferativen Prozessen kommen kann.

Aus dieser Sicht scheint der Einsatz von NSAIDs bei chronischen Entzündungen problematisch (10), da im wesentlichen die akuten Symptome und weniger die Ursachen der Erkrankung behandelt werden. Andererseits liefern das Fehlen effizienter Alternativen sowie die vorliegende klinische Erfahrung Argumente für den Einsatz solcher Medikamente.

1.3 Entzündungshemmende Arzneistoffe

Für die Behandlung entzündlich-rheumatischer Erkrankungen stehen zur Zeit drei Gruppen von Medikamenten zur Verfügung (11,12):

- I) Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs)
- II) Glucocorticoide
- III) Basistherapeutika wie Penicillamin, Goldpräparate, Chloroquin, Immunsuppressiva etc.

Während die Gruppe der Basistherapeutika hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen sehr heterogen ist, hemmen Glucocorticoide in erster Linie die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten auf der

Ebene der Phospholipasen. Daneben spielen membranstabilisierende und immunsuppressive Eigenschaften dieser Substanzen eine Rolle.

Der wichtigste Wirkungsmechanismus der NSAIDs besteht in der Unterdrückung der Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Cyclooxygenase. Im folgenden soll nur dieser Aspekt der anti-phlogistischen Therapie behandelt werden.

1.3.1 Übersicht über die wichtigsten synthetischen Hemmstoffe der Prostaglandinbiosynthese [nach (12)]

Neben der Acetylsalicylsäure selbst gehört die Gruppe der Fenamate (N-Aryl-Anthranilsäurederivate wie z.B. Mefenaminsäure) zu den Salicylsäurederivaten im weiteren Sinne. Eine weitere Gruppe bilden Derivate des Indometacins, die eine Aryl- oder Heteroarylessigsäurestruktur besitzen: Man unterscheidet bei den Phenylelessigsäurederivaten die Fenac-Gruppe (wichtigster Vertreter: Diclofenac) und die Profen-Gruppe (z.B. Ibuprofen).

Zu den neueren Entwicklungen zählt die Gruppe der Oxicame (z.B. Piroxicam).

Das Pyrazolidinderivat Phenylbutazon stellt insofern eine Besonderheit dar, als es nicht die Cyclooxygenase, sondern den zweiten Teilschritt der PG-Synthese (die Hydroperoxidase-Reaktion) hemmt (13).

Alle NSAIDs besitzen noch erhebliche Nebenwirkungen, größtenteils bedingt durch PGS-Hemmung selbst. So sind unter der Therapie auftretende Läsionen der Magenschleimhaut eine Folge der Reduktion von zytoprotektiv wirkendem PGE_2 und PGI_2 in der Mukosa.

Schwindel, Hautreaktionen und Blutbildveränderungen sind als weitere Nebenwirkungen bekannt geworden (3,14).

1.3.2 Pflanzliche Substanzen mit Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese

Während eine Vielzahl von hochpotenten synthetischen Cyclooxygenaseinhibitoren hergestellt werden konnte, sind bisher nur wenige Naturstoffe von ähnlicher Wirkstärke aufgefunden worden. Systematische Untersuchungen mit Pflanzenextrakten sind bisher nur in einem Arbeitskreis (15) durchgeführt worden. Tab. 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Naturstoffe mit Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese.

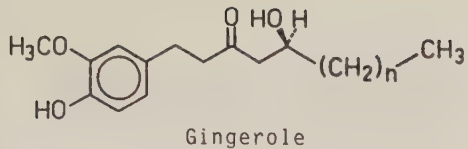
Die ausführlichsten Untersuchungen mit isolierten Reinsubstanzen wurden in der Klasse der Flavonoide von WURM u. Mitarb. (16,17,18) sowie MICHEL et al. (19) durchgeführt. Von allen getesteten Verbindungen erwies sich das Galangin ($IC_{50} = 5,5 \mu M$) als der wirksamste Cyclooxygenaseinhibitor. Flavonoide mit ortho-Dihydroxystruktur in Ring A oder B waren wirksamer als Flavonole mit freier 3-OH-Gruppe (18). Die Hemmwirkung von Quercetin scheint von der gewählten Substratkonzentration abzuhängen (19,20,21). Auch gewisse prenylierte Flavonoide (22,23) erwiesen sich vermutlich aufgrund ihrer gegenüber den einfachen Flavonoiden erhöhten Lipophilie als gut wirksam. Auch Catechin ($IC_{50}=130 \mu M$) zeigte eine Wirkung in Cyclooxygenasetestsystemen (19,25).

In der Klasse der einfachen Phenole und phenolischen Phenylpropanverbindungen wurden zunächst Verbindungen aus Cannabis (24,25) und später vor allem Eugenol und seine Derivate als potente Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese erkannt (26,27). Im Arbeitskreis von SANKAWA wurden einige stark PGS-inhibierende Diarylheptanoide bzw. Phenylalkan-on-ole aus der Zingiberaceen-Familie (28,29,30) isoliert. Für einige Depside mit Alkylseitenkette aus Lichen-Arten konnten ebenfalls starke Hemmwirkungen gefunden werden (31).

Tab. 1: Aus Pflanzen isolierte Hemmstoffe der Prostaglandinbiosynthese

Substanz	IC ₅₀ (µM)	Testsystem*	Vorkommen	Stoffklasse	Lit.
10-Gingerdion	1,0	RRM-CO	Zingiber officinale	Phenylalkan-on	(29)
6-Dehydrogingerdion	1,0	RRM-CO	"	"	(29)
6-Gingerol	5,5	RRM-CO	"	Phenylalkan-on-ol	(29)
7-(4''-Hydroxy-3''-methoxyphenyl)- 1-phenyl-3,5-heptandion	2,0	RRM-CO	Alpinia officinarum	Diarylheptanoid	(28)
1-(4''-Hydroxy-3''-methoxyphenyl)- 7-phenyl-3-heptanon	0,5	RRM-CO	Alpinia oxyphylla	"	(28)
Eugenol	34	BSVM-CO	Myristica fragrans	Phenylpropanderivat	(25)
"	12	SSVM-CO	"	"	(26)
Cannabinol	70	BSVM-CO	Cannabis sativa	"	(24)
Carvacrol	27	BSVM-CO	"	Terphenenol	(25)
Olivetol	100	BSVM-CO	"	Phenylpropanderivat	(24)
"	13	SSVM-CO	"	"	(36)
Galangin	5,5	BSVM-CO	Alpinia officinarum	Flavonol	(19)
"	20	Thr.-CO	"	"	(19)
Morusin	10	Thr.-CO	Morus alba	Prenyl-Flavon	(22)
Luteolin	100	RtRM-CO	Reseda luteola	Flavon	(16)
"	60	Thr.-CO	"	"	(19)
Morin	120	RtRM-CO	Chlorophora tinctoria	Flavonol	(16)
Phloretin	45	BSVM-CO	Malus-species	Dihydrochalkon	(19)
(+)-Catechin	130	RtRM-CO	(weit verbreitet)	Flavan-3-ol	(16)
Wogonin	5,6	PMNL-CO	Scutellaria baical.	Flavanon	(37)
Quercetin	15	Thr.-CO	(weit verbreitet)	Flavonol	(19)
"	1,5-100	SSVM-CO	"	"	(20)
4-O-Methylchryptochlorophaeinsre.	0,3	RRM-CO	Lichen-species	Depsid	(31)

*) Erläuterung der Abkürzungen im Text (S. 12)



$n = 4, 6, 8$

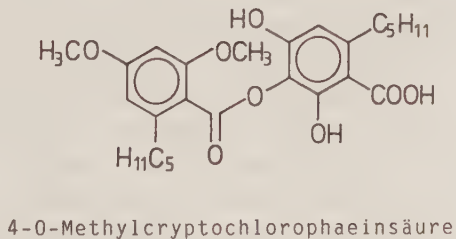
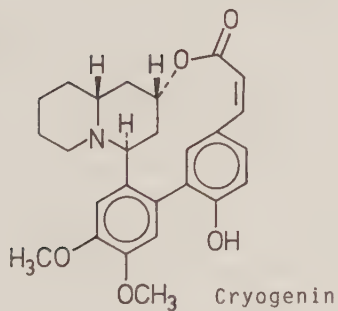
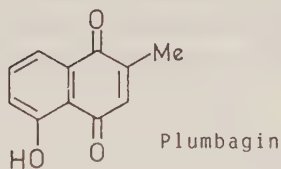
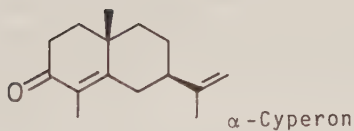
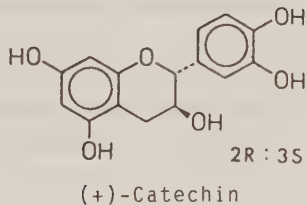
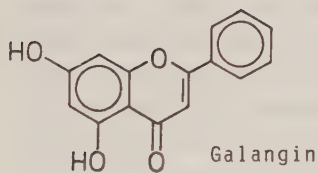
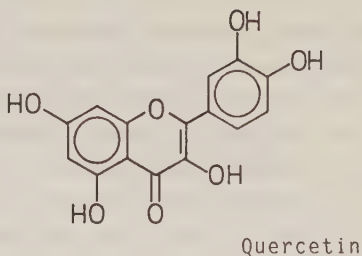
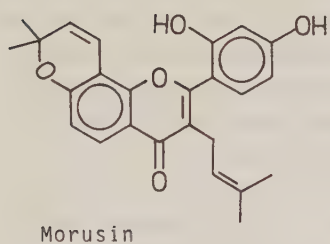
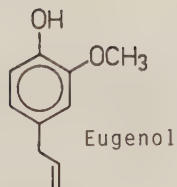


Abb. 2: Formelübersicht zu Kap. 1.3.2

Aus anderen Naturstoffklassen wurden einige Chinazolidinalkaloide, die in der Seitenkette zusätzlich einen Phenolring enthalten, als wirksam erkannt (32).

Aus der Gruppe der Tanningerbstoffe wurde über Hemmwirkungen im Konzentrationsbereich von $>100 \mu\text{M}$ berichtet (33).

Auch das Naphthochinon Plumbagin zeigte in hoher Konzentration (1 mM) Hemmwirkungen auf die Prostaglandinbiosynthese (34,35). Zu den wenigen bisher gefundenen nichtphenolischen Naturstoffen mit PGS-Hemmwirkung gehören die Sesquiterpene α -Cyperon und Isocyperol aus *Cyperus rotundus* (15).

Beim Vergleich der IC_{50} -Werte in Tab. 1 sollte beachtet werden, daß die Autoren verschiedene Cyclooxygenase(CO)-Testsysteme benutzten: So wurden neben mikrosomalen Präparationen von Schafsamenblase (SSVM), Rindersamenblase (BSVM) und Kaninchen- (RRM) oder Rattennierenmark (RtRM) auch Thrombozyten (Thr.) und Polymorphkernige Leukozyten (PMNL) (teils als Ganzellsysteme, teils als Homogenate) verwendet.

Die therapeutische Relevanz von Hemmwirkungen im Bereich 500-1000 μM , wie für bestimmte Flavonoide beschrieben (17), ist zweifelhaft.

Obwohl einige Substanzen gute in-vitro-Hemmwirkungen zeigten, ist bisher keine der geprüften Verbindungen therapeutisch zum Einsatz gekommen.

2 Suche nach neuen potentiellen pflanzlichen Antiphlogistika

2.1 Gründe für ein Pflanzenscreening

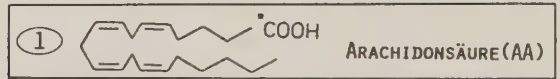
Obwohl von den Pflanzenstoffen bisher nur die Salicylsäure Ausgangspunkt für die Darstellung potenter therapeutisch zum Einsatz gelangter Arzneistoffe wie z.B. Aspirin[®] war, gibt es in der Volksmedizin vieler Länder eine Vielzahl von Drogen, die in Form von Tees, Extrakten oder Umschlägen zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen Verwendung finden. Eine vor mehreren Jahren durchgeführte Computerrecherche erbrachte über 600 Literaturzitate, in denen über Drogen mit antiphlogistischer oder antirheumatischer Wirkung berichtet wurde. Die ROTE LISTE (81) verzeichnet unter der Indikation Analgetika/Antirheumatika allein zur äußerlichen Anwendung mindestens 68 Phytopräparate.

Diese Zahlen beweisen, daß es unter den pflanzlichen Drogen noch zahlreiche unentdeckt gebliebene Wirkprinzipien geben muß, die in isolierter Form oder nach chemischer Strukturabwandlung für die Therapie in Frage kommen können. Daß solche Versuche nicht früher unternommen worden sind, lag einzig und allein an der Tatsache, daß es bislang keine geeigneten in-vitro-Testsysteme gab, mit denen ein systematisches Screening von vielen Extrakten und Verbindungen hätte durchgeführt werden können.

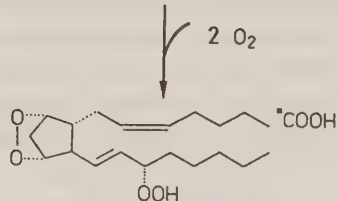
2.2 Verwendete pharmakologische in-vitro-Screeningmethoden

Da die Prostaglandinsynthese (über den Cyclooxygenaseweg) den wesentlichsten Angriffspunkt der NSAIDs bildet, kommt Cyclooxygenase-Testsystemen besondere Bedeutung für das Screening zu. Darüberhinaus konnte eine hervorragende Korrelation zwischen PG-Synthesehemmung in vitro und Entzündungshemmung im in-vivo-Experiment (Rattenpfotenödem) gezeigt werden (38). Wir verwendeten deshalb verschiedene Cyclooxygenasemodelle für unser Screening (Kap. 2.3 und 2.4). Ergänzend dazu wurden einige Substanzen im 5-Lipoxygenasetest unseres Arbeitskreises untersucht (Kap. 2.5).

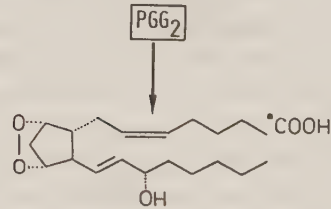
PROSTAGLANDINBIOSYNTHESE



CYCLOOXYGENASE

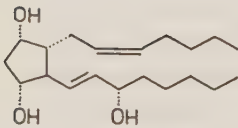


HYDROPEROXIDASE

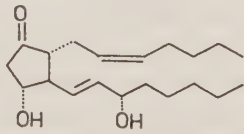


REDUKTASE/
ISOMERASEN

②



③



④

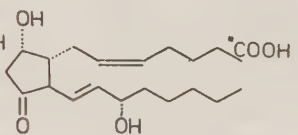


Abb. 3: Prostaglandinbiosynthese

2.3 Prostaglandinbiosynthese in Schafsamenblasenmikrosomen

Zu den schon am längsten und häufigsten verwendeten Enzymquellen für in-vitro-Untersuchungen der Prostaglandinbiosynthese zählen die Schafsamenblasenmikrosomen.

Abb. 3 zeigt die enzymatischen Teilschritte der Prostaglandinbiosynthese aus Arachidonsäure.

Die Prostaglandin H Synthase ist ein Glykoprotein vom MG 70000-80000 Dalton, das zwei enzymatische Aktivitäten aufweist (Cyclooxygenase und Hydroperoxidase), die nicht voneinander getrennt werden können. Daraus wird geschlossen, daß sie auf ein- und demselben Protein lokalisiert sind (66).

In Schafsamenblasen wurde die PGH-Synthase auf der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Reticulums und der Kernmembran nachgewiesen (39). Dort wurde ebenfalls eine PGH-PGE-Isomerase (auch PGE-Synthase genannt) gefunden (40). Die PGH-PGD-Isomerisierung wird durch ein lösliches, im Cytoplasma lokalisiertes Enzym katalysiert (41). Der Mechanismus der Bildung von $\text{PGF}_2\alpha$ ist noch unklar (41). Alle drei genannten Prostaglandine können auch nichtenzymatisch durch Zerfall aus PGH_2 entstehen (42).

Ablauf der Tests: Um Einflüsse von Inhibitoren auf die Prostaglandinsynthese zu erfassen, wird eine mikrosomale Proteinfraction (in Pufferlsg.) mit exogener Arachidonsäure, Cofaktoren und der Testsubstanz über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Dabei bestehen grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten, den Einfluß der Inhibitoren zu erfassen:

2.3.1 HPLC-Bestimmung der Arachidonsäuremetaboliten = Prostaglandinsynthasetest*)

Man verwendet [$1\text{-}^{14}\text{-C}$]-markierte Arachidonsäure als Substrat und extrahiert nach Beendigung der Reaktion die gebildeten Arachidonsäuremetaboliten. Diese können dann nach chromatographischer Trennung bestimmt werden. Das Verhältnis der gebildeten Produkte zu nicht umgesetzter Arachidonsäure ist ein Maß für die Inhibition der Prostaglandinbiosynthese.

Trennung:

In der Literatur wird zu Screeningzwecken stets eine dünn-schichtchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte vorgenommen. Um die Trennschärfe und damit auch die Genauigkeit der Methode zu verbessern, haben wir das Screeningsystem erstmals mit einer HPLC-Methode kombiniert:

Ausgehend von Vorschlägen in der Literatur (43,44) entwickelten wir ein Laufmittelsystem aus Acetonitril-Wasser-Gemisch (unter Zusatz von H_3PO_4), das innerhalb von 28 min alle gebildeten Arachidonsäuremetaboliten auf reversed-phase-Material auftrennt. Die Peakidentifizierung erfolgte durch Cochromatographie (46) mit unmarkierten Referenzsubstanzen, die, soweit nicht im Handel erhältlich, nach der Methode von PORTER et al. (45) hergestellt wurden.

Um die Reproduzierbarkeit der Testmethode und die Genauigkeit der HPLC-Methode zu überprüfen, führten wir eine Musterinkubation mit dem Referenzinhibitor Indomethacin durch:

In sechs getrennten Inkubationen erhielten wir eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese von 83,15 % mit einer absoluten Standardabweichung s_{n-1} von 2,05 %. Dem entspricht eine relative Standardabweichung von 2,47 %.

Für die HPLC-Methode ergab sich bei 5-maliger Einspritzung der gleichen Probe eine rel. Standardabweichung von 4,24 % bezogen auf die Peakfläche von PGE_2 , 7,48% bezogen auf PGD_2 und 8,19 % bezogen auf $PGF_{2\alpha}$.

Die Hemmung der Biosynthese von PGE_2 errechnet sich nach der Formel:

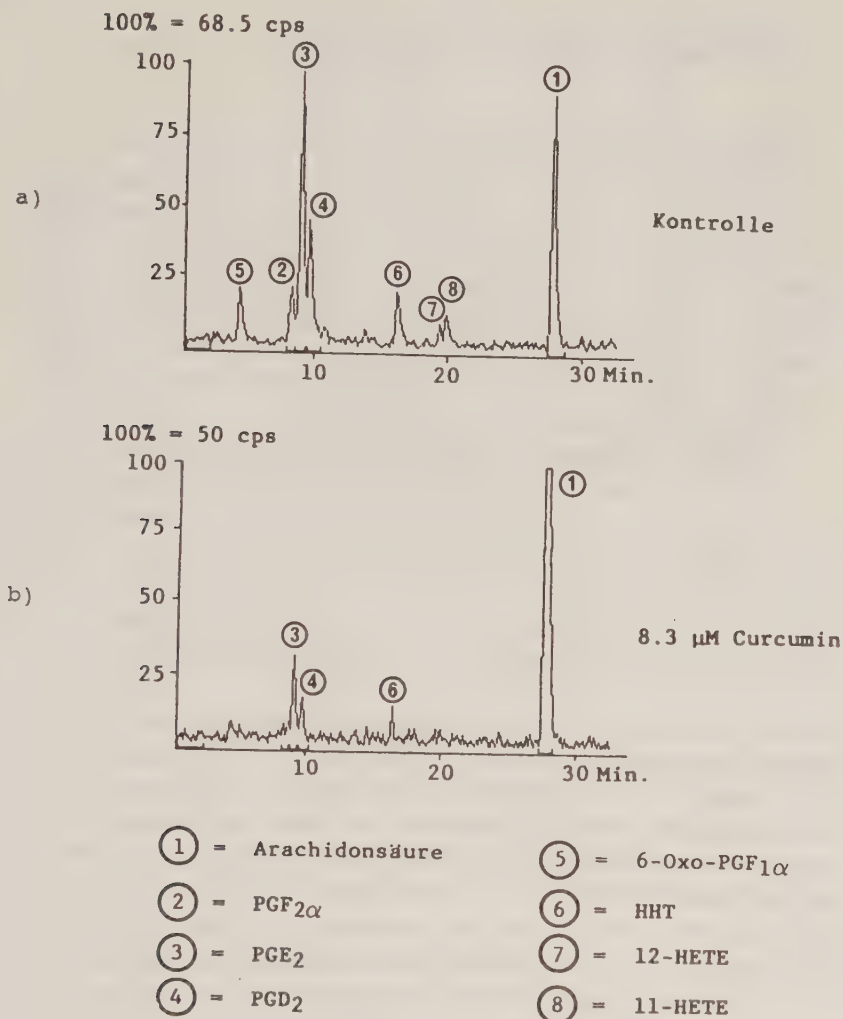
$$\text{Hemmung (\%)} = 100 - \frac{\% \text{ PGE}_2 \text{ (Probe)} \times 100}{\% \text{ PGE}_2 \text{ (Kontrolle)}}$$

*)Da bei dieser Methode über die Messung der aus Arachidonsäure gebildeten Metaboliten die Aktivität aller enzymatischen Teilschritte der Prostaglandinbiosynthese (siehe Abb. 3) erfaßt wird, soll diese Methode im folgenden als

"Prostaglandinsynthesetest" bezeichnet werden.

Abb. 4 zeigt die HPLC-Trennung der aus Inkubationsansätzen extrahierten Arachidonsäuremetaboliten

- a) ohne Zusatz eines Inhibitors (= Kontrolle) und
 b) mit Zusatz des von uns gefundenen Inhibitors Curcumin (8.3 $\mu\text{mol/l}$) im Trennsystem HPLC-PGS1.



Mit einem weiteren, von uns entwickelten zweistufig-isokratischen Trennsystem (HPLC-PGS2) konnten wir die Auftrennung der Prostaglandine noch weiter verbessern und die Analysenzeit auf 24 min verkürzen. Die Nebenprodukte der Reaktion (Hydroxyfettsäuren) können in diesem System allerdings nicht bestimmt werden.

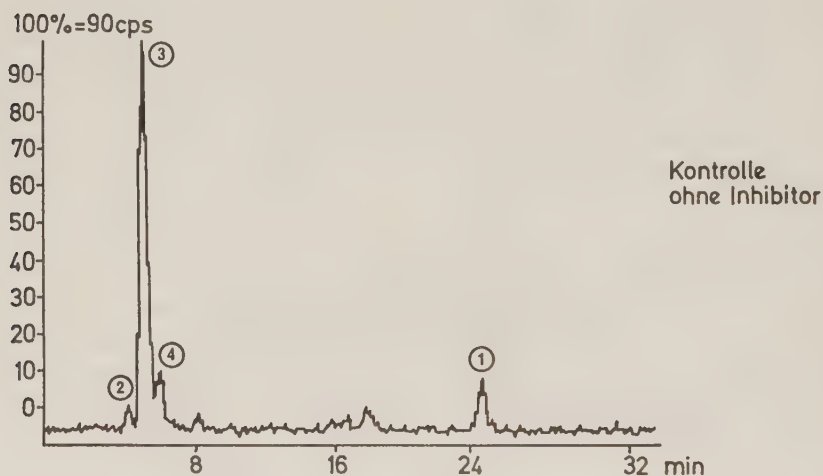


Abb. 5: HPLC-Trennung der Prostaglandine im Trennsystem PGS2

Detektion: Aufgrund der geringen molaren Extinktionskoeffizienten der Prostaglandine im UV-Bereich ($\epsilon=16500$ bei 192 nm (44)) ergibt sich bei UV-Detektion eine geringe Empfindlichkeit, die zudem durch Pflanzeninhaltsstoffe oder Extraktbestandteile, welche aus dem Inkubationsansatz mitextrahiert werden, gestört würde.

Wir verwendeten daher $[1-^{14}\text{-C}]$ -markierte Arachidonsäure als Substrat. Mit Hilfe eines Radioaktivitätsdurchflußmonitors wurden selektiv nur die daraus gebildeten Arachidonsäuremetaboliten detektiert.

Die Inkubationsbedingungen wurden im wesentlichen in Anlehnung an eine von KÜHL et al. (47) publizierte Methode gewählt. Der Einfluß der Testbedingungen auf die erhaltenen Ergebnisse und die Optimierung der Testbedingungen werden im Kap. 3 diskutiert.

2.3.2 Erfassung der Cyclooxygenaseaktivität über Messung der initialen O₂-Einbaurrate = Cyclooxygenasetest

Soll nur der erste Teilschritt der Prostaglandinbiosynthese, die Cyclooxygenasereaktion erfaßt werden, so bietet sich eine zweite Möglichkeit der Untersuchung an: Ähnlich wie im Prostaglandinsynthasetest nach Kap. 2.3.1 wird auch hier eine mikrosomale Proteinfraction mit Inhibitor und Arachidonsäure inkubiert. Die Cyclooxygenaseaktivität kann anhand der initialen Sauerstoffeinbaurrate mittels einer Sauerstoff-sensitiven Elektrode bestimmt werden. Diese Methodik (69) ist weniger aufwendig als die in 2.3.1 beschriebene. Insbesondere kann man bei dieser Methode die Substratkonzentration ohne Schwierigkeiten variieren und daher auch kinetische Untersuchungen durchführen. Wegen der Empfindlichkeit der Sauerstoff-Elektrode können nur Substanzen getestet werden, die entweder Aceton-, Puffer- oder DMSO-löslich sind. Für Screening und Extrakttestung bedeutet dies eine wesentliche Einschränkung.

2.4 Arachidonsäuremetabolismus in Humanthrombozyten

Um das Wirkprofil und den Wirkungsbereich noch mehr einzugrenzen, ist es zweckmäßig, Inhibitoren der Schiffsamenblasencyclooxygenase in weiteren Testsystemen zu untersuchen. Wir wählten menschliche Thrombozyten, die über den Cyclooxygenaseweg HHT und Thromboxan B₂, über den 12-Lipoxygenaseweg 12-HETE bilden (49,50,51). Dieses "Ganzzellsystem" erlaubt Aussagen über das Verhalten der Inhibitoren unter den "physiologischen" Bedingungen einer intakten Zelle, wobei vor allem die Membrangängigkeit einer Substanz Voraussetzung ist.

2.4.1. HPLC-Methode zur Trennung und Identifizierung der Metaboliten

Aus menschlichem Blut angereicherte, intakte Thrombozyten werden hierbei in Pufferlösung mit Inhibitor und exogener [$1-^{14}\text{C}$]-Arachidonsäure inkubiert.

Nach Extraktion der Metaboliten erfolgt deren Auftrennung und Quantifizierung wie in 2.3.1 beschrieben.

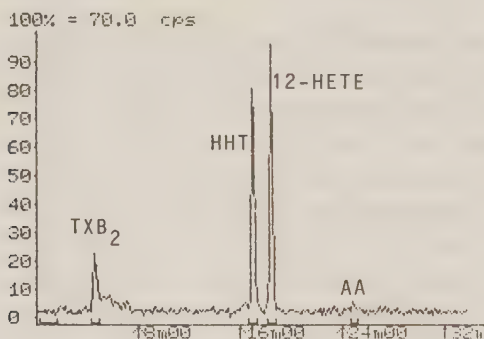
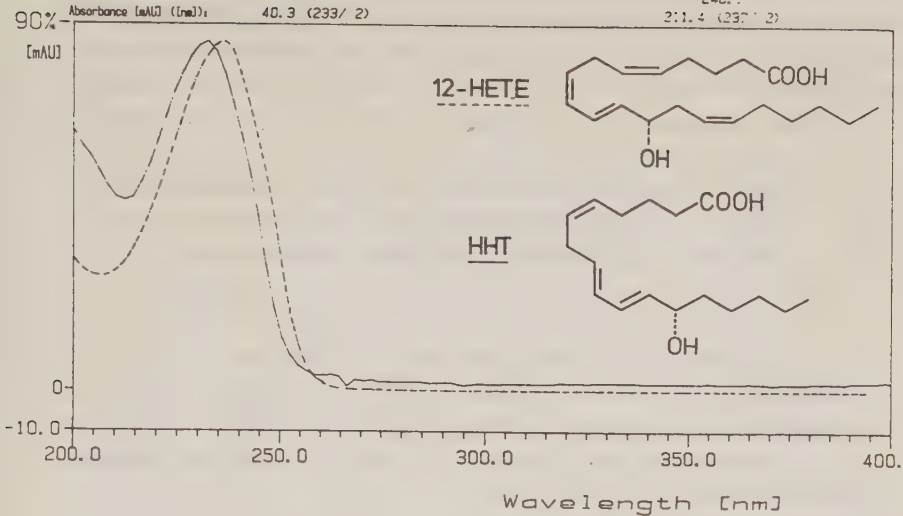


Abb. 6: HPLC-Trennung der aus Humanthrombozyten extrahierten Arachidonsäuremetaboliten im Trennsystem HPLC-PGS 2

Die Identifizierung und Zuordnung der Peaks erfolgte anhand der in der Literatur (43) beschriebenen Elutionsreihenfolge bei HPLC-Trennung auf reversed-phase-Material und der von HAMBERG u. SAMUELSSON (49) angegebenen UV-Maxima für HHT und 12-HETE. HHT (12-Hydroxy-5cis,8trans,10trans-heptadecatriensäure) zeigt ein Maximum bei 232 nm und eluiert früher als 12-HETE (12-Hydroxy-5cis,8cis,10trans,14cis-eicosatetraensäure), die durch die cis-trans-Anordnung der konjugierten Doppelbindungen ihr Maximum bei 237 nm zeigt. Wir vereinigten mehrere Reaktionsgemische und nahmen mittels eines Photodiodenarraydetektors on-line die UV-Spektren auf. Für HHT fanden wir 233 nm, für 12-HETE 237 nm als Maxima.

Date: 05/17/1987
 Spectrum [min]: 13.2438
 Reference [min]: 13.5268
 Attn [a.u.]: 47.0
 Absorbance [a.u.] (nm): 40.3 (233/ 2)

05/17/1987
 14.4535
 14.6587
 246.7
 211.4 (237/ 2)



Date: 06/16/1987
 Spectrum [min]: 3.7800
 Reference [min]: 4.2428
 Attn [a.u.]: 12.0
 Absorbance [a.u.] (nm): 10.3 (191/ 2)

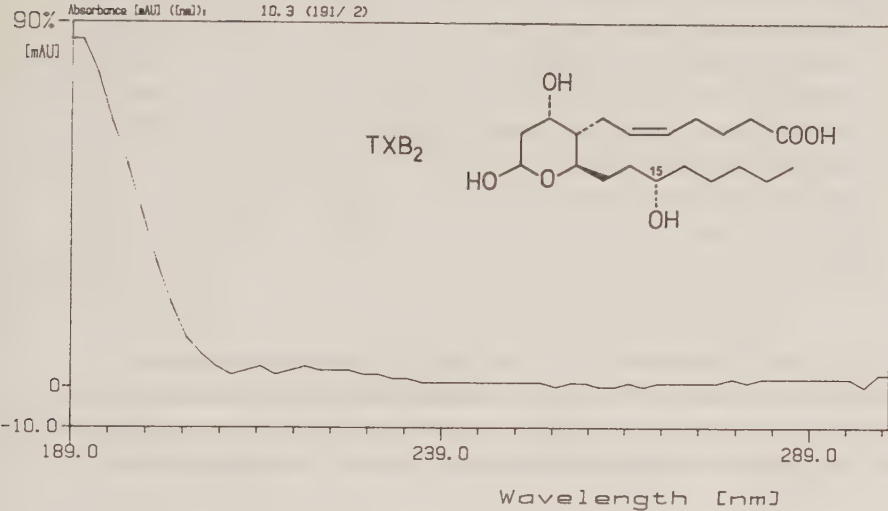


Abb.7: UV-Spektren von HHT, 12-HETE, TXB₂
 (während der HPLC-Trennung on-line aufgenommen)

Auch für den dritten Metaboliten, das TXB₂, das aus TXA₂ entsteht, stimmte das gefundene Maximum (192 nm) mit den Literaturwerten (44) überein. Darüberhinaus bewiesen wir die Zuordnung durch Cochromatographie mit authentischer Thromboxan-Referenzsubstanz (Fa. Sigma).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die mit einer Reihe von später im einzelnen noch beschriebenen phenolischen Verbindungen im Vergleich zu Referenzsubstanzen erhaltenen Ergebnisse:

Substanz	Konz.	TXB ₂	HHT	12-HETE	AA
Kontrolle		10,5	31,1	31,1	1,5
Indomethacin	(2,5 µM)	-	-	64,9	-
ASS	(50 µM)	-	8,4	35,4	-
Curcumin	(50 µM)	-	2,8	66,7	-
Carvacrol	(50 µM)	-	3,9	93,5	-
Esculetin	(100 µM)	4,8	17,3	44,8	23,7
Eugenol	(50 µM)	1,4	4,2	84,3	1,9
Urushiol	(5 µM)	3,1	10,5	50,9	9,8

Die Werte geben den Anteil (%) der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität an.

Tab. 2: Ergebnisse im Thrombozytentest

Hierbei wird erkennbar, wie von Cyclooxygenaseinhibitoren jeweils die über diesen Weg gebildeten Produkte HHT und TXB₂ im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden. In den meisten Fällen findet eine verstärkte Bildung des 12-Lipoxygenaseproduktes 12-HETE statt.

2.4.2 Thromboxanbestimmung durch Radioimmunoassay *)

Bei dieser Methode wird im Gegensatz zu der in Kap. 2.4.1 beschriebenen die Thromboxanbildung aus exogener Arachidonsäure in Thrombin-stimulierten menschlichen Thrombozyten bestimmt. Dazu wird frisch gewonnenes "Plättchenreiches Plasma" (PRP) mit Thrombin und der Testsubstanz inkubiert. Das innerhalb von 15 min gebildete Thromboxan wird durch Radioimmunoassay nach der Methode von SIESS et al. (52) bestimmt und kann mit Kontrollinkubationen ohne Inhibitor verglichen werden.

2.5 5-Lipoxygenaseweg in polymorphkernigen Leukozyten (PMNL)

In den letzten Jahren ist auch die Bedeutung des 5-Lipoxygenaseweges für entzündliche Erkrankungen ausführlich untersucht worden (siehe 3). Insbesondere hat das Interesse an dualen Hemmstoffen, sowohl der Cyclooxygenase als auch der 5-Lipoxygenase, stark zugenommen, weil man annimmt, daß so ein "shift" des Substrates (wie er bei selektiver Hemmung eines der beiden Wege vorkommen kann) verhindert werden kann (53,54). Wir haben daher einige der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen auch im 5-Lipoxygenasetest, der in unserem Arbeitskreis durchgeführt wird (55), untersucht. Die Methodik ist prinzipiell die gleiche wie beim Prostaglandinsynthesetest (2.3.1). Anstelle der Schafsamenblasenmikrosomenfraktion werden hier Leukozyten (PMNL) von Schweinen verwendet, deren 12-Lipoxygenase und Cyclooxygenase durch Zusatz von ETYA gehemmt waren. Nach Inkubation der Zellen mit Arachidonsäure, Ionophor 23187, ETYA und Inhibitor lassen sich als Hauptprodukte LTB₄ und 5-HETE neben geringen Mengen 12-HETE und 5S,12S-DiHETE extrahieren.

HPLC-Auftrennung, Detektion und Auswertung erfolgen analog der in 2.3.1 beschriebenen Methode. Referenzsubstanzen für dieses Assaysystem sind Nordihydroguajarsäure (NDGA) und Kaffeesäure mit IC₅₀-Werten von 1,5 µM bzw. 80 µM.

*) Die Versuche wurden in der Kinderpoliklinik der Universität München (Dr. med. habil. W. Dorsch) durchgeführt.

3 Optimierung und Modifizierung des PG-Synthesetestes

Beim Vergleich von Testergebnissen, durchgeführt mit ein- und derselben Substanz (z.B. Tab. 1 im Kap. 1.3.2 und Tab. 3), fällt auf, daß oft erheblich differierende IC_{50} -Werte gefunden wurden, selbst wenn mit der gleichen Enzympräparation oder dem gleichen Zellsystem gearbeitet wurde. Dasselbe gilt, wenn man unsere eigenen Testergebnisse mit denen der Literatur vergleicht (Tab. 6 im Kap. 5.1).

IC ₅₀ -Werte (µM) von Indomethacin			Testsystem

10	Smith und Lands	(1971)	Schafsamenblasenmikrosomen
0,45	Ham et al.	(1972)	"
2,0	Raz et al.	(1973)	"
0,35	Young et al.	(1974)	"
6,5	Ku und Wasvary	(1975)	"
0,5	Gaut et al.	(1975)	"
2,0	Takeguchi und Sih	(1972)	Rindersamenblasenmikrosomen
7,0	Tomlinson et al.	(1973)	"
38,0	Flower et al.	(1973)	"
0,8	Burstein et. al	(1973)	"
1,0	Collier	(1974)	"
0,5	Ho und Esterman	(1974)	"
0,1	Gryglewski	(1974)	"
1,4	Horodniak et al.	(1974)	"
21,0	Deby et al.	(1975)	"

Tab. 3: IC_{50} -Werte von Indomethacin nach (57)

In Reviewartikeln erklären FLOWER (56), GRYGLEWSKI (57) sowie LANDS und HANEL (58) diese Abweichungen der IC_{50} -Werte mit den von Autor zu Autor unterschiedlich gewählten Testbedingungen wie Substratkonzentration, Cofaktoren, Inkubationszeit, Dauer der Vorinkubation etc..

Testergebnisse sind daher nur unter bestimmten Bedingungen vergleichbar. Die von uns gewählten Versuchsbedingungen entsprechen der von KUHLE et al. (47) publizierten Methode. Um die verschiedenen Einflüsse der Versuchsbedingungen auf die Ergebnisse in unserem Testsystem kennenzulernen, haben wir mit dem von uns beim Screening des etherischen Öles von *Ledum palustre* (Kap. 6) als guten Cyclooxygenaseinhibitor aufgefundenen Carvacrol einige grundlegende Experimente durchgeführt.

3.1 Substratkonzentration:

Diese Experimente wurden mit dem in Kap. 2.1.1 beschriebenen Cyclooxygenasetestsystem durchgeführt.

Wir untersuchten Carvacrol und den Referenzinhibitor Indomethacin im Cyclooxygenasetest in vier verschiedenen Substratkonzentrationen.

Die Erhöhung der Substratkonzentration bewirkte wie erwartet eine gesteigerte Grundrate des initialen Sauerstoffverbrauchs. Bezieht man die bei Zusatz des Inhibitors gefundenen Werte auf diese Grundrate (als rel. 100 %), so kann man den IC_{50} ablesen (vgl. Abb. 8).

Der IC_{50} von Carvacrol erfährt einen "shift" von 50 μM (bei 70 μM AA) über 18 μM (bei 17 μM AA) bis auf 6 μM (bei 5,5 μM AA) (vgl. Abb. 10).

Auch der in unserem Prostaglandinsynthesetest ermittelte IC_{50} -Wert von 4 μM (bei 1 μM AA) paßt in diese Reihe.

Führt man das gleiche Experiment mit Indomethacin durch (Abb. 9), so erhält man dagegen einen praktisch konstanten IC_{50} -Wert (vgl. Abb. 10).

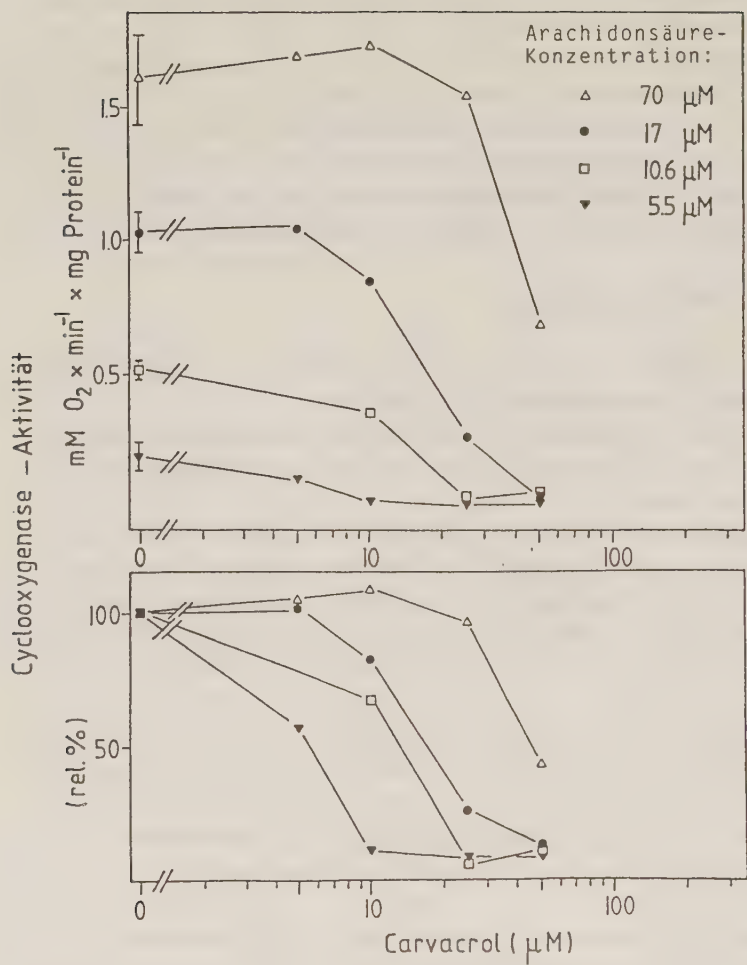


Abb. 8: Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität durch Carvacrol bei verschiedenen Substratkonzentrationen

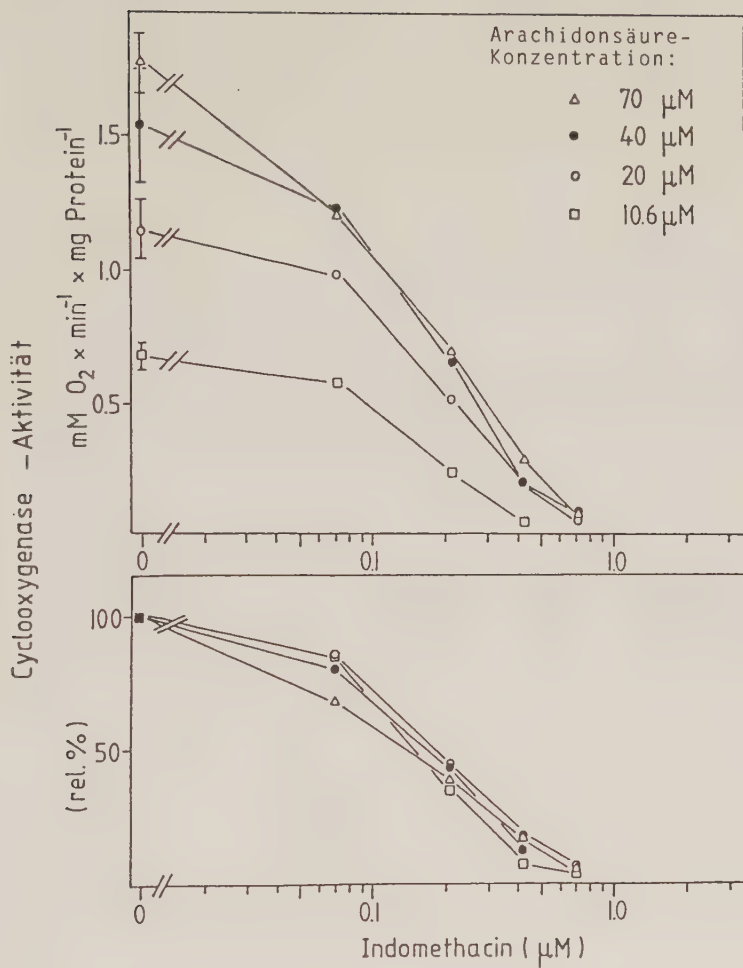


Abb. 9: Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität durch Indomethacin bei verschiedenen Substratkonzentrationen

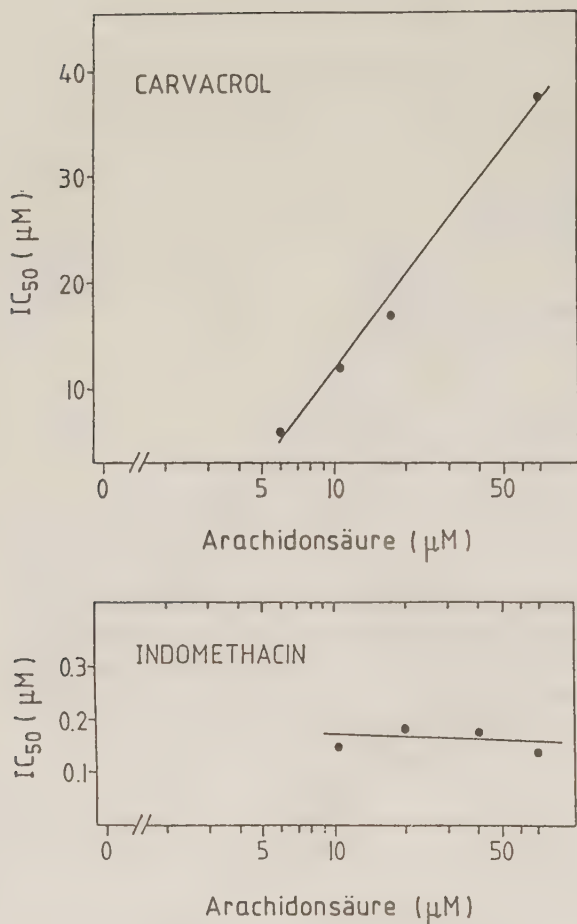


Abb. 10: Vergleich der IC_{50} -Werte von Carvacrol und Indomethacin bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich von EGAN und GALE (59) mit Piroxicam, Paracetamol und L651.896 bei Arachidonsäurekonzentrationen von 2-100 μM gemacht. Auch hier waren die IC_{50} -Werte für Indomethacin und Ibuprofen praktisch konstant, während die der übrigen Substanzen mit zunehmender Substratkonzentration anstiegen.

Wenn man berücksichtigt, daß unter in-vivo-Bedingungen in der Zelle nur eine sehr geringe Menge an freier Arachidonsäure für die Prostaglandinbiosynthese zur Verfügung steht, so könnte dies eine gute Erklärungsmöglichkeit für die bekannte in-vivo-Wirksamkeit dieser phenolischen Verbindungen sein, die bisher in Modellen, die mit hoher Substratkonzentration arbeiten, nicht gefunden wurde (60).

Nach LANDS und HANEL (58) könnten die Schwankungen der IC_{50} -Werte einen Hinweis auf das Vorliegen eines kompetitiven Hemmmechanismus für die Substanzen geben, deren IC_{50} mit steigender Substratkonzentration zunimmt.

Beim Indomethacin hingegen, das einen zeitabhängig-irreversiblen Hemmechanismus aufweist, ist der IC_{50} -Wert nicht abhängig von der Substratkonzentration.

3.2 Einfluß von Cofaktoren

Zur Stimulierung der Prostaglandinbiosynthese werden in der Literatur häufig Cofaktoren zugesetzt, die neben dem Gesamtumsatz auch das Produktmuster und den Grad der Enzyminhibition beeinflussen können (61,62).

GSH: reduziertes Gluthation (1 mM) beeinflusste in unseren Versuchen nicht die Cyclooxygenaseaktivität. Allerdings wird das Produktmuster zugunsten von PGE_2 verändert, was mit der in der Literatur (56) beschriebenen Funktion als Stimulator der PGH-PGE-Isomerase übereinstimmt. Für unsere Screeninguntersuchungen setzten wir GSH zu, weil die Bildung eines Hauptproduktes (PGE_2) die Genauigkeit der quantitativen Auswertung erhöht.

Phenolischer Cofaktor: Viele Autoren verwenden einen phenolischen Cofaktor wie Phenol, Adrenalin oder Hydrochinon, um die Peroxidasereaktion (PGG_2 - PGH_2) zu stimulieren (56,63,64). Dadurch wird eine Akkumulation von PGG_2 verhindert, das als Hydroperoxid auch zur Selbstinaktivierung des Enzyms beitragen kann. Da die meisten Cyclooxygenaseinhibitoren aus Pflanzen

(siehe Tab. 1) phenolische Verbindungen sind, untersuchten wir den Einfluß eines phenolischen Cofaktors auf die Hemmwirkung eines phenolischen Inhibitors.

Wir haben daher Carvacrol, das sich bei unseren Screeninguntersuchungen im Prostaglandinprodukttest mit Adrenalinzusatz als guter Inhibitor erwiesen hatte, im Cyclooxygenasetest ohne Adrenalin, mit 0,5 mM und mit 1 mM Adrenalin-Zusatz untersucht. Die Arachidonsäurekonzentration betrug für alle Versuche 70 μ M, jeweils unter Zusatz von 1 mM GSH.

Ohne Zusatz von Adrenalin stimuliert Carvacrol bis zur Konzentration von 10 μ M die Cyclooxygenaseaktivität und führt bei höheren Konzentrationen zu einer Hemmung mit IC_{50} bei 48 μ M. Gibt man 0,5 mM Adrenalin als Cofaktor zu, so stimuliert Carvacrol, von einer schon erhöhten Grundrate ausgehend, nur noch schwach und führt ab 10 μ M ebenfalls zu einer Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität (IC_{50} = 38 μ M).

Bei 1 mM Adrenalin im Reaktionsansatz scheint das Enzymsystem schon soweit stimuliert zu sein, daß der Zusatz von Carvacrol zu einer dosisabhängigen Enzyminhibition mit IC_{50} bei 17 μ M führt.

Vergleicht man die drei erhaltenen IC_{50} -Werte, so wird deutlich, daß durch den Adrenalinzusatz ein "shift" nach niedrigeren IC_{50} -Werten resultiert (vgl. Abbildung 11).

Ähnliche Phänomene wurden von GRYGLEWSKI und Mitarb. (62) für Paracetamol und von EGAN und Mitarb. (65) für Guaajacol und eine Reihe weiterer phenolischer Substanzen beschrieben. GRYGLEWSKI (62) erklärt so die Wirkung von Paracetamol, das unter gewissen Testbedingungen zwar als PGS-Stimulator erscheint, aber in vivo doch analgetisch und antipyretisch wirksam ist. LANDS und HANEL (60) erklären die in-vivo-Wirksamkeit solcher phenolischer Inhibitoren damit, daß das Peroxidasepotential normaler Zellen wesentlich höher ist als unter (nicht-stimulierten) in-vitro-Bedingungen. Er konnte durch Zusatz von GSH-Peroxidase zu solchen in-vitro-Ansätzen zeigen, daß Phenolen dann eine inhibitorische Wirkung zukommt.

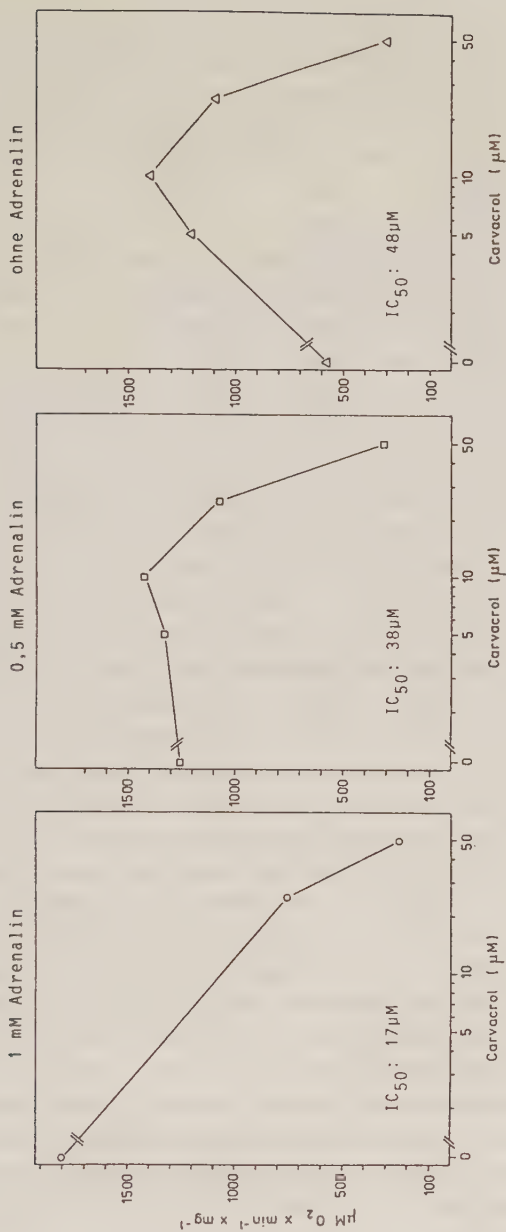


Abb. 11: Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität durch Carvacrol bei verschiedenen Konzentrationen des Cofaktors Adrenalin

Sowohl GRYGLEWSKI als auch LANDS und HANEL (62,60) folgern aus ihren Versuchen, daß neben mikrosomalen Fraktionen, denen die genuinen Cofaktoren und sonstigen "physiologischen Bedingungen" der intakten Zelle fehlen, stets andere Testsysteme (Ganzzellsysteme) zur Charakterisierung von Inhibitoren mitbezogen werden sollten.

Wir haben daher Carvacrol mit menschlichen Thrombozyten als Cyclooxygenasemodell mit zwei unterschiedlichen Testmethoden untersucht (detaillierte Beschreibung siehe Kap. 6) und dort die Hemmwirkung auf die Cyclooxygenase (ohne den Einfluß exogener Cofaktoren) bestätigen können.

Erklärung des biphasischen Effekts von Carvacrol:

Die Wirkungsweise des Adrenalins als phenolischer Cofaktor besteht darin, daß es im zweiten enzymatischen Teilschritt der Prostaglandinbiosynthese, der Peroxidasereaktion, zu Adrenochrom oxidiert wird und somit als Reduktionsäquivalent für die Reduktion von PGG_2 zu PGH_2 zur Verfügung steht (63,66). Die Fähigkeit der Prostaglandin H-Synthase, eine ganze Reihe von Substanzen zu "cooxidieren", wurde 1975 entdeckt (67) und seither intensiv erforscht. Die auf diesem Wege mögliche metabolische Aktivierung von Präcarcinogenen war dabei der Grund für das große Interesse vieler Toxikologen (68).

(vgl. Abb. 12)

Wir benutzten die bei solchen Untersuchungen verwendete Methodik (69,70), um den Mechanismus der Enzymstimulierung durch Carvacrol zu erklären:

Carvacrol ($20 \mu\text{M}$) wurde mit mikrosomalem Protein aus Schafsaamenblasenhomogenat und Arachidonsäure inkubiert. Nach dem Ende der Reaktion wurde angesäuert und mittels HPLC das im Ansatz vorhandene Carvacrol bestimmt.

Wir fanden eine gegenüber der ursprünglich eingesetzten Menge an Carvacrol deutlich erniedrigte Konzentration von Carvacrol. Dieser Abbau des Carvacrols durch die enzymatische Reaktion war Arachidonsäure-abhängig und konnte durch Zusatz von Indomethacin gehemmt werden.

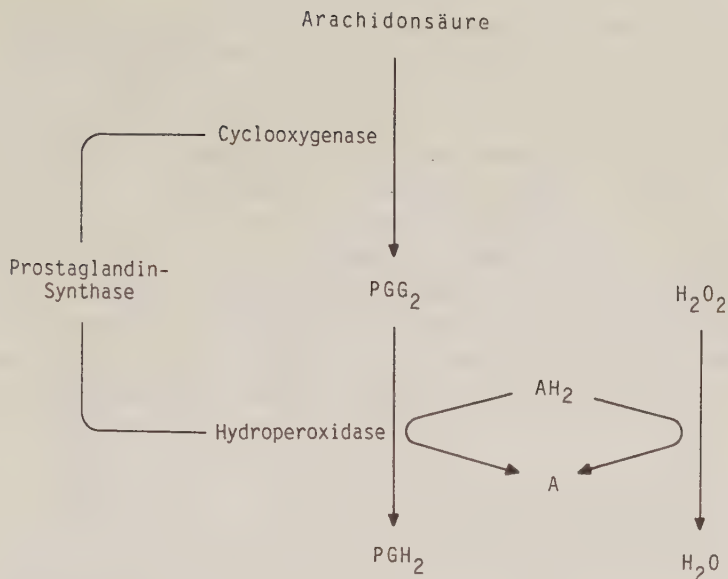


Abb. 12: Cooxidation durch die Prostaglandinsynthase:
Elektronendonator (AH_2) wird zu A cooxidiert

Um sicherzugehen, daß es sich um einen enzymkatalysierten Vorgang handelt, wurden auch Versuchsansätze mit hitzeinaktiviertem Enzym bzw. ohne Enzym durchgeführt. Durch Verwendung von H_2O_2 als Substrat konnten wir demonstrieren, daß die Peroxidasereaktion der Ort des Abbaus von Carvacrol ist. Insgesamt zeigt der Versuch, daß bei Inkubation von Carvacrol mit Prostaglandinsynthase (ohne Zusatz von Adrenalin) ein bestimmter Teil des Carvacrols von der Peroxidase zu einem noch unbekannten Produkt cooxidiert werden kann. Vorstellbar wäre die Bildung eines Radikals, das dann dimerisiert, oder die Entstehung eines Adduktes mit mikrosomalem Protein, wie es z.B. für Paracetamol gezeigt werden konnte (71).

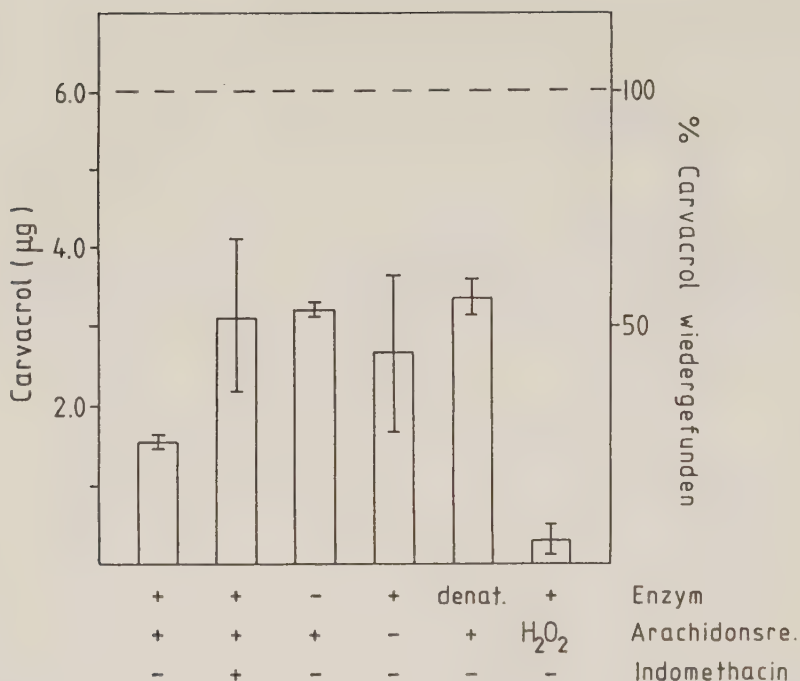


Abb.13: Cooxidationsexperimente mit Carvacrol

Die Tatsache, daß mit H_2O_2 mehr Carvacrol cooxidiert wird als bei der Arachidonsäure-abhängigen Reaktion, spricht dafür, daß Carvacrol einerseits zu einer Cyclooxygenasehemmung (und damit auch zu einer Hemmung der AA-abhängigen Cooxidation) führt und andererseits den Peroxidaseteilschritt durch seine Cooxidierbarkeit stimulieren kann. Die Kombination dieser beiden Effekte würde sich auch gut mit dem Verhalten in Gegenwart bzw. Nichtgegenwart von Adrenalin decken: Ohne Adrenalin dient Carvacrol als Cofaktor und zeigt in gewissen Konzentrationen Stimulierungseffekte, während bei höherer Konzentration die dominierende Cyclooxygenasehemmung die Reaktion zum Stillstand bringt.

Setzt man hingegen Adrenalin zu, übernimmt dieses die Funktion des Cosubstrates der Peroxidasereaktion und Carvacrol wirkt bei bereits stark stimulierter Peroxidase stark inhibitorisch. Folglich resultiert bei steigender Adrenalinkonzentration im Versuchsansatz ein niedrigerer IC_{50} -Wert von Carvacrol. Da sich in unseren Versuchen mit Thrombozyten (also unter den Bedingungen eines Ganzzellsystems) (Kap.6.2.1.5) das Carvacrol als Inhibitor der Cyclooxygenase erwies und wir damit die Interpretation von LANDS und HANEL (60) bezüglich der "physiologischen Bedingungen" bestätigt fanden, wählten wir für unsere Screeninguntersuchungen einen Zusatz von 1 mM Adrenalin, um eine gleichmäßig hohe Peroxidaseaktivität (wie in vivo) zu gewährleisten.

3.3 Enzympräparation und sonstige Versuchsbedingungen

Enzympräparation: Wir verwendeten eine Mikrosomenpräparation aus Schafsamensamenblasenhomogenat, die wir durch Ultrazentrifugation herstellten. Das erhaltene Pellet wurde auf zwei verschiedene Methoden weiterverarbeitet. Bei der Präparation E1 nach (72) lyophilisierten wir das Pellet durch Gefrier-trocknung, bei Präparation E2 suspendierten wir das Pellet in Phosphatpuffer pH 7.5 und froren es portioniert bei $-70^{\circ}C$ ein [nach (70)].

Die Vorgehensweise bei E2 erwies sich als wesentlich schonender und ergab eine wesentlich höhere spezifische Enzymaktivität.

Da wir bei beiden Präparationen trotz Lagerung bei $-70^{\circ}C$ im Laufe der Lagerzeit Aktivitätsverluste beobachten konnten, mußte die eingesetzte Enzymmenge für den Test variiert werden. Wir wählten die Proteinmenge so, daß möglichst eine 90%ige Umsetzung des Substrates bei der Kontrolle vorlag. Von den mitgeführten Referenzsubstanzen Indomethacin und Eugenol wurde der IC_{50} überprüft und somit gleichbleibende Bedingungen für das Screening gewährleistet.

Inkubationszeit und pH: Als Inkubationszeit wählten wir wie KUHL et al. (47) 20 min, um eine möglichst hohe Produktausbeute zu erhalten.

Die Dauer der Vorinkubation betrug - wie häufig in der Lit.- 5 min. Aus der Literatur (58) ist bekannt, daß ihre Dauer Auswirkungen auf die Hemmwerte von zeitabhängig-irreversiblen Inhibitoren wie z.B. Indomethacin haben kann.

Der pH-Wert des Tris-HCl-Puffers wurde entsprechend dem von WALLACH und DANIELS (73) angegebenen Optimum auf pH 7.9 eingestellt.

Verwendbare Lösungsmittel: Für das Extraktsscreening scheint dieses Testsystem gut geeignet, da neben dem Inkubationspuffer eine Reihe organischer Lösungsmittel unterhalb bestimmter Volumenprozentanteile verwendet werden können: Wir verwendeten in der Regel EtOH p.a. (2,5% des Gesamtvol.). Nach (64) sind bis zu 5% EtOH möglich. Weiterhin können auch DMSO oder Aceton bis zu 2,5% des Inkubationsvolumens eingesetzt werden (67,74).

Extrakt-Begleitstoffe: Bei der Testung pflanzlicher Rohextrakte ist zu beachten, daß große Mengen an Chlorophyllabbauprodukten dann störend wirken, wenn mit sehr geringen Mengen eines hochaktiven Enzymproteins gearbeitet wird. Vermutlich kommt es hier zu unspezifischen Bindungsphänomenen. Daher empfiehlt es sich, diese Begleitstoffe durch Fällungsreaktionen oder andere Vorreinigungsschritte (z.B. SEPPAK[®]-Kartuschen) abzutrennen.

Enthält der Extrakt große Mengen an Tanningerbstoffen, so sollten auch diese ggf. entfernt werden, da sie Hemmeffekte zeigen. Diese von Gerbstoffen verursachten Hemmungen wurden in den Kap. 7 und 8 eingehend untersucht und diskutiert.

4 Auswahl der Drogen und Inhaltsstoffe für eigene Untersuchungen

Die Auswahl geeigneter Drogen bzw. Inhaltsstoffe für das Screening erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Drogen, die in Erfahrungsmedizin, Volksmedizin oder Homöopathie rein empirisch bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen verwendet wurden. (vgl. dazu Kap. 4.1 und Kap. 4.2)
2. Drogen, für die in der Literatur eine antiphlogistische Aktivität beschrieben ist, ohne daß das Wirkprinzip bekannt oder näher charakterisiert ist.
3. Isolierte Pflanzeninhaltsstoffe, die strukturelle Ähnlichkeit zu bereits aus der Literatur bekannten Wirkstoffen zeigen.

4.1 In Volks-, Erfahrungsmedizin und Homöopathie verwendete Drogen

Die folgende Übersicht (Tab. 4) enthält in- und ausländische Drogen, die volks- oder erfahrungsmedizinisch bzw. in der Homöopathie bei rheumatischen Erkrankungen verwendet werden. Als Literaturquellen dienten HOPPE "Drogenkunde" (75), HAGER "Handbuch der pharmazeutischen Praxis" (76), WICHTL "Teedrogen" (77), BRAUN "Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker" (78), das "Homöopathische Repetitorium-DHU" (79), ein Lehrbuch der Homöopathie (80) sowie eine eigene, umfangreiche Literaturrecherche.

Soweit diese Drogen in der Allopathie und in der Homöopathie verwendet werden, ist dies in der Rubrik "Anw." mit "+H" gekennzeichnet. Werden die Drogen nur in der Homöopathie verwendet, so ist dies durch "H" gekennzeichnet.

Tab. 4: Antirheumatisch verwendete Drogen:

Pflanze	Familie	verwendeter Teil	Anw.
<i>Aconitum napellus</i>	Ranunculaceae	Knolle, Kraut	+H
<i>Acorus calamus</i>	Araceae	ether. Öl	
<i>Adenanthera parvonia</i>	Fabaceae	Blätter	
<i>Aegopodium podagria</i>	Apiaceae	Kraut	+H
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Hippocastanaceae	Blüte, Samen	+H
<i>Agauria salicifolia</i>	Ericaceae	ganze Pflanze	
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	Kraut	
<i>Agropyron repens</i>	Poaceae	Rhizom	
<i>Alocasia macrorrhiza</i>	Araceae	versch. Teile	
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	Asteraceae	Wurzel	+H
<i>Andira araroba</i>	Fabaceae	Pulver a.d. Stamm	
<i>Angelica archangelica</i>	Apiaceae	Wurzel und Frucht	
<i>Antalea azadirachta</i>	Meliaceae	fettes Öl d. Samen	
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Ericaceae	Blätter	
<i>Arnica montana</i>	Asteraceae	Blüten	
<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	ether. Öl	
<i>Asarum europaeum</i>	Aristolochiaceae	Wurzel	H
<i>Asteracantha longifolia</i>	Acanthaceae	Kraut	
<i>Asystasia gangetica</i>	Acanthaceae	ganze Pflanze	
<i>Atherosperma moschatum</i>	Monimiaceae	Rinde	
<i>Belamcanda chinensis</i>	Iridaceae	Wurzel	
Betula-Arten	Betulaceae	Teer	
<i>Betula lenta</i>	Betulaceae	Rinde	
<i>Boucerosia stocksiana</i>	Asclepiadaceae	ganze Pflanze	
<i>Bowdichia virgiloides</i>	Fabaceae	Rinde	
<i>Brassica nigra</i>	Brassicaceae	Samen, ether. Öl	
<i>Brunfelsia hopeana</i>	Solanaceae	Wurzel	
<i>Bryonia alba</i> u. <i>dioica</i>	Cucurbitaceae	Wurzel	+H
<i>Calandrinia discolor</i>	Portulacaceae	ganze Pflanze	
<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	Blüten	
<i>Calluna vulgaris</i>	Ericaceae	Blüten	+H
<i>Capparis decidua</i>	Capparaceae	Rinde	

Pflanze	Familie	verwendeter Teil	Anw.
<i>Capsicum annum</i>	Solanaceae	Frucht	
<i>Carapa guianensis</i>	Meliaceae	Samenfett	
<i>Chamomilla recutita</i>	Asteraceae	Blüten	
<i>Chrysanthemum vulgare</i>	Asteraceae	ether. Öl	
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Ranunculaceae	Rhizom	
<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	Destillat=Campher	
<i>Coix lacryma-jobi</i>	Poaceae	Samen	
<i>Colchicum autumnale</i>	Liliaceae	Knolle	H
<i>Comarum palustre</i>	Rosaceae	Kraut	
<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Frucht	
<i>Cyclamen purpurascens</i>	Primulaceae	Wurzelknolle	H
<i>Solanum dulcamara</i>	Solanaceae	Blätter, Triebe	H
<i>Drosera rotundifolia</i>	Droseraceae	Kraut	H
Echinodurus-Arten	Alismataceae	Blätter, Rinde, W.	
<i>Eucomis punctata</i>	Liliaceae	Zwiebeln	
<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	ether. Öl	
<i>Fagopyrum vulgare</i>	Polygonaceae	ganze Pflanze	H
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae	Holztee	
<i>Filipendula ulmaria</i>	Rosaceae	Kraut, Blüten	+H
<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae	Blätter	
<i>Fraxinus japonica</i>	Oleaceae	Rinde	
<i>Gaultheria procumbens</i>	Ericaceae	ether. Öl	
<i>Gelsemium sempervirens</i>	Loganiaceae	Wurzel	H
<i>Guajacum officinale</i>	Zygophyllaceae	Holz, Harz, ether. Öl	+H
<i>Harpagophytum procumb.</i>	Pedaliaceae	Wurzel	
<i>Hedeoma pulegioides</i>	Lamiaceae	Kraut, ether. Öl	+H
<i>Hedera helix</i>	Araliaceae	Kraut	+H
<i>Hemerocallis flava</i>	Liliaceae	Pflanze	
<i>Kalmia latifolia</i>	Ericaceae	Blätter	H
<i>Laurus nobilis</i>	Lauraceae	Preßöl, ether. Öl	
<i>Lavandula officinalis</i>	Lamiaceae	ether. Öl	
<i>Ledum palustre</i>	Ericaceae	Kraut	+H
<i>Leonurus lanatus</i>	Lamiaceae	Kraut	+H
<i>Lolium temulentum</i>	Poaceae	Same	H

Pflanze	Familie	verwendeter Teil	Anw.
Mandragora officinarum	Solanaceae	Kraut	H
Melilotus officinalis	Fabaceae	Kraut	
Menyanthes trifoliata	Menyanthaceae	Blätter	+H
Mercurialis annua	Euphorbiaceae	Kraut	H
Myristica fragrans	Myristicaceae	ether. Öl	
Ononis spinosa	Fabaceae	Wurzel	
Origanum majorana	Lamiaceae	ether. Öl	
Paeonia officinalis	Paeoniaceae	Wurzel	H
Philodendron-Arten	Araceae	Blätter, Zweige	
Phytolacca americana	Phytolaccaceae	Wurzel	+H
Polygonum-Arten	Polygonaceae	Kraut	
Populus nigra	Salicaceae	Knospen	
Ranunculus acer	Ranunculaceae	Kraut	+H
Rhododendron-Arten	Ericaceae	Blätter	+H
Ruta graveolens	Rutaceae	Kraut	H
Rosmarinus officinalis	Lamiaceae	Blatt, ether.Öl	
Salix-Arten	Salicaceae	Rinde	+H
Symphytum officinale	Boraginaceae	Wurzel	
Stellaria media	Caryophyllaceae	ganze Pflanze	H
Tamus communis	Dioscoreaceae	Rhizom	
Thymus serpyllum	Lamiaceae	Kraut, ether.Öl	
Trifolium repens	Fabaceae	Blüten	
Toxicodendron radicans	Anacardiaceae	Blätter	H
Urtica dioica	Urticaceae	Blatt, Kraut, Samen	
Vaccinium vitis-idea	Ericaceae	Blätter, Blüten	
Verbascum phlomoides	Scrophulariaceae	Blätter	+H
Veronica officinalis	Scrophulariaceae	Kraut	
Viola tricolor	Violaceae	Kraut	

Ausgewählt wurde von uns für eine phytochemisch-pharmakologische Untersuchung 1.) Ledum palustre L., da diese Droge sowohl in der Erfahrungsmedizin als auch in der Homöopathie benutzt wird. 2.) Als zweite Droge wählten wir das homöopathische Basismittel bei Gelenk- und Muskelrheumatismus Rhus toxicodendron = Toxicodendron radicans (L.) KUNTZE.

4.2 "Rheuma"-Präparate, die pflanzliche Extrakte oder etherische Öle enthalten

Für das Screening wählten wir außerdem solche Extrakte bzw. etherische Öle aus, die in den im Handel befindlichen Phytopräparaten mit der Indikation "entzündlich-rheumatische Erkrankungen" enthalten sind. Eine genaue Analyse der Externa, die in der Roten Liste 1987 (81) unter der Rubrik Analgetika / Antirheumatika verzeichnet sind, ergibt für die verwendeten Bestandteile pflanzlicher Herkunft folgende Übersicht:

Tab.5: Pflanzliche Bestandteile in Externa mit der Indikation
"Entzündlich-rheumatische Erkrankungen"

Bestandteil	Häufigkeit der Verwendung	
Campher	in 35	Präparaten
Aetheroleum Rosmarini	in 27	"
Aetheroleum Terebinthinae	in 23	"
Extractum Capsici	in 14	"
Menthol	in 12	"
Aetheroleum Pini silvestris	in 11	"
Aetheroleum Eucalypti	in 10	"
Aetheroleum Thymi bzw. Thymol	in 8	"
Extractum Symphyti	in 7	"
Aetheroleum pini pumilionis	in 6	"
Aetheroleum Juniperi	in 6	"
Aetheroleum/Extr. Caryophylli	in 5	"
Außerdem werden mehrfach verwendet: Allylsenföl, Arnikatinktur bzw. -Extrakt und Extrakte von Ledum palustre und Rhus toxicodendron sowie Zimtöl und Knoblauchsft.		

5. Screening verschiedener Inhaltsstoffgruppen

5.1 Phenolische Verbindungen

In unsere Untersuchungen wurden auch einige schon in anderen Arbeitskreisen untersuchte Verbindungen miteinbezogen, um zu überprüfen, inwieweit unsere Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen. Als Referenzsubstanz diene -wie üblich- Indomethacin.

Tab. 6:

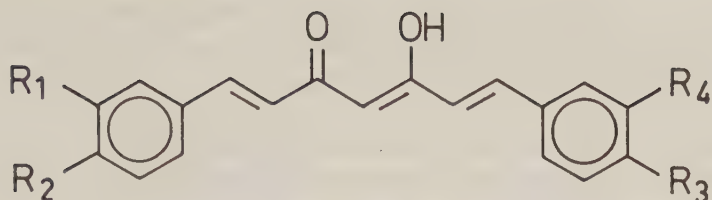
Testsubstanz	IC ₅₀ (µM)	Literaturwert	Autor
Eugenol	11,0	12,0 bzw. 34	(25,26)
Capsaicin	3,8	32,0	(26)
Carvacrol	4,0	27,0	(25)
Indomethacin	1,2	0,35 - 10,0	siehe Kap.3.1

Wie in Tab. 6 gezeigt, konnten mit Eugenol und Indomethacin die Ergebnisse anderer Autoren bestätigt werden. Die Abweichungen der IC₅₀-Werte von Capsaicin und Carvacrol von den Literaturwerten liegen im üblichen Rahmen (Tab. 3 im Kapitel 3 informiert über die Schwankungen der IC₅₀-Werte von Indomethacin bei verschiedenen Autoren.)

Im Kap. 3 wurde der Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Testergebnisse und die dadurch auftretenden Schwankungen der IC₅₀-Werte eingehend untersucht und diskutiert.

Für die phenolische Verbindung Curcumin aus *Curcuma longa* liegen einige tierexperimentelle Untersuchungen vor (82,83). Sein Wirkungsmechanismus ist aber noch ungeklärt.

Außer Curcumin wurden noch die ebenfalls in *Curcuma longa* vorkommenden Verbindungen Monodesmethoxycurcumin und Bis-desmethoxycurcumin sowie zwei synthetische Derivate (48) untersucht.



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
b	OCH ₃	OH	OH	H
c	H	OH	OH	H
d	H	H	H	H
e	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 14: getestete Curcumin-Derivate

Die stärkste Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese zeigte das Monodesmethoxycurcumin. Bisdesmethoxycurcumin und Curcumin (hier ermittelten wir eine IC₅₀ von 8,8 µM) unterschieden sich in ihrer Hemmwirkung praktisch nicht. Hingegen führte die völlige Methylierung der phenolischen OH-Gruppen bei (e) zu einer starken Reduktion der Hemmwirkung.

Substanz	Hemmwirkung bei 50µM *)
a) Curcumin	85,4 %
b) Monodesmethoxycurcumin	94,4 %
c) Bisdesmethoxycurcumin	86,9 %
d) 5-Hydroxy-1,7-diphenyl- 1,4,6-heptatrien-3-on	36,6 % +)
e) 5-hydroxy-1,7-bis-(3,4-dimethoxy)- 1,4,6-heptatrien-3-on	20,3 %

*) Mittelwerte aus 2 Messungen

+) Bei Verbindung (d) ohne phenolische Gruppen konnten wir eine Verschiebung des Metabolitenmusters der Arachidonsäure (unter Bildung von bisher nicht identifizierten Produkten) beobachten.

Phenolische Gruppen scheinen Voraussetzung für eine starke Hemmwirkung zu sein. Die stärkste Hemmwirkung ging vom Monodesmethoxycurcumin (b) aus. Daß diese Verbindung mit einer Guajacolstruktur in einem aromatischen Ring stärker inhibierend wirkt als (c) mit einer Methoxygruppe weniger, bestätigt die Beobachtungen von SANKAWA und Mitarb. (28) mit Diarylheptanoiden aus *Alpinia officinarum*.

Die Untersuchungsergebnisse weiterer phenolischer Verbindungen finden sich in den Kap. 5.3 und 5.5 . Screeningergebnisse mit Gerbstoffen werden im Kap. 7 diskutiert.

5.2 Etherische Öle und deren Inhaltsstoffe

Fast alle Phytopharmaka des Handels, die bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden, enthalten etherische Öle oder einzelne Etherischöl-Komponenten (siehe Kap. 4.2).

Für das Screening setzten wir 7,5 µg Öl pro ml Inkubat ein. Wenn man von einem mittleren Molekulargewicht der Hauptbestandteile (Monoterpene und Phenylpropane) von 200 ausgeht, entspricht dies rein rechnerisch einer Konzentration von 37 µmol / l.

Die stärkste Hemmwirkung zeigte das Nelkenöl. Die gefundene Hemmwirkung übertraf in diesem Fall sogar den für den Hauptinhaltsstoff Eugenol gefundenen Wert. Dies könnte auf das Vorliegen weiterer stark wirksamer Bestandteile schließen lassen, die -in geringer Menge vorliegend- zur Gesamtwirkung beitragen. Ähnliche Beobachtungen sind von LAEKEMAN und Mitarb. bei der Untersuchung des Öls von *Myristica fragrans* gemacht worden (84).

Auch das Zimtöl zeigt eine im Vergleich zu seinem Eugenolgehalt (ca. 6 %) sehr starke Hemmwirkung.

Etherisches Öl (7,5 µg/ml)		Hemmung der Prostaglandinbiosynthese*)
Cinnamomi aetheroleum	DAB 7	51,9 %
Caryophylli aetheroleum	DAB 8	84,1 %
Matricariae aetheroleum		16,9 %
Ledi palustris aetheroleum		46,6 %
Eucalypti aetheroleum	Ph.Eur.III	20,4 %
Thymi aetheroleum		35,2 %
Pini pumilionis aetheroleum	Erg.B.6	18,9 %
Rosmarini aetheroleum		15,3 %
Oleum Sinapis		4,8 %
Terebinthinae aetheroleum		--
Pini silvestris aetheroleum	Erg.B.6	--
Juniperi aetheroleum	DAB 6	--
Calami aetheroleum	DAB 6	--
Rhododendri ferrug. aetheroleum		--

[Tab. 8]

*) Mittelwerte aus 2 Messungen

Die Hemmwirkung des Thymianöles dürfte auf seinen Gehalt an Thymol und Carvacrol zurückzuführen sein. Wie unsere weiteren Untersuchungen (Kap.6) zeigten, war Carvacrol der wirksame Bestandteil des Ledumöls. Das häufig verwendete Rosmarinöl und die vor allem bei entzündlichen Erkrankungen der Atemwege eingesetzten Pinusöle zeigten dagegen keine starken Wirkungen. Hier dürfte ebenso wie beim Kamillenöl ein anderer Wirkungsmechanismus zugrunde liegen. Auch für Guajazulen, für das DEW-HIRST(27) eine Cyclooxygenasehemmung vermutete, konnten wir nur eine mäßige Hemmwirkung feststellen.

Interessanterweise zeigte Aceteugenol eine stärkere Hemmwirkung als Eugenol selbst. Es wäre denkbar, daß es hier ähnlich wie bei der Acetylsalicylsäure zu einer irreversiblen Übertragung einer Acetylgruppe auf das Enzym kommt. Die Wirkung von Aceteugenol auf die Cyclooxygenase menschlicher Thrombozyten wurde inzwischen in einem anderen Arbeitskreis bestätigt (84).

Tab. 9: Hemmung der Prostaglandinbiosynthese durch
isolierte Reinsubstanzen

Substanz	Konzentration	Hemmung der Prostaglandinbiosynthese*)
Aceteugenol	37 μ M	93,8 %
Apiol	50 μ M	-
L-Bornylacetat	50 μ M	-
(+)-Campher	50 μ M	-
β -Caryophyllen	50 μ M	-
Carvacrol	37 μ M	94,0 %
1,8-Cineol	50 μ M	-
Citral	50 μ M	-
Eugenol	37 μ M	69,5 %
Guajazulen	37 μ M	29,9 %
Ledol	37 μ M	-
(-)-Menthol	50 μ M	-
Palustrol #)	50 μ M	-
β -Pinen	50 μ M	-
p-Cymen	50 μ M	-
trans-Isoasarol	37 μ M	18,6 %
Thymol	37 μ M	87,5 %

#) = angereicherte Fraktion - = Hemmung < 5 %

*) Mittelwerte aus 2 Messungen

Stellt man einen Struktur-Wirkvergleich an, so fällt auf, daß die wirksamsten Substanzen mit Ausnahme des Aceteugenols durchweg freie phenolische OH-Gruppen aufweisen. Die Maskierung der OH-Gruppen führt zum Wirkungsverlust, wie der Vergleich der Hemmwirkung von Eugenol mit der des Apiols zeigt.

Neben der phenolischen OH-Gruppe (vgl. p-Cymen/Carvacrol oder Eugenol/Anethol) scheint das Vorliegen eines aromatischen Ringsystemes Voraussetzung für die Inhibitorwirkung zu sein (vgl. Menthol/Carvacrol).

Sämtliche nichtaromatischen Terpene (Menthol, Cineol, β -Pinen, Campher, β -Caryophyllen, Bornylacetat) waren in unserem Test inaktiv.

Interessanterweise sind die am häufigsten in Präparaten verwendeten Verbindungen Campher und Menthol keine Hemmstoffe der Prostaglandinsynthase. Ihre beschriebenen guten Wirkungen dürften daher eher auf den kühlenden Effekt, den diese Verbindungen auslösen, zurückzuführen sein. Einige der untersuchten Öle (Rosmarinöl, Terpentinöl) werden vermutlich aufgrund ihrer hyperämisierenden Eigenschaften angewendet. Darüberhinaus dürfte bei einigen besonders stark irritierend wirkenden Ölen der sogen. "Counter-irritant-Effekt" (siehe Kap. 5.3) für ihre Wirkung mitverantwortlich sein.

5.3 Scharfstoffe und Irritantien

Da zu den bereits bekannten Cyclooxygenaseinhibitoren auch einige Scharfstoffe und Irritantien zählen (z.B. die Gingerole und Eugenol), haben wir weitere Verbindungen aus dieser Gruppe untersucht. Die gefundenen Hemmwerte bei der Screeningkonzentration von 37 μM sind jeweils in Klammern angegeben:

aus der Gruppe der o-Methoxyphenolverbindungen bzw. der entsprechenden Öle wurde neben dem bereits erwähnten Nelkenöl (84,1%) und Eugenol (69,5%) noch das Öl von Asarum europaeum (7,5%) und ein Wirkstoff, das trans-Isoasarone (18,6 %) getestet. Das Kalmusöl war ebenso unwirksam wie Apiol, das über keine freie phenolische OH-Gruppe mehr verfügt.

Von den Säureamidverbindungen hemmte das in vielen extern angewendeten Präparaten enthaltene Capsaicin aus Capsicum annum L. (79 %) die Prostaglandinbiosynthese wesentlich stärker als Piperin aus Piper nigrum (33,4%). Schwarzes Pfefferöl und ein Pfefferlignan zeigten keinerlei Einfluß auf unser Testsystem.

Die Wirkung des Capsaicins erscheint unter therapeutischen Gesichtspunkten besonders deshalb interessant, da es zugleich an den Nozizeptoren der afferenten Neuronen angreift und durch Entleerung der die Substanz P bildenden Neuronenspeicher einen analgetischen Effekt hervorruft (86). Allylsenfö (4,8%) war praktisch nicht wirksam und auch das als Hautirritans bekannte Cantharidin war ohne Hemmwirkung. Die Wirkung einer weiteren hautirritierenden Verbindung, Urushiol aus Toxicodendron radicans, wird im Kap. 7 beschrieben und diskutiert.

Ein direkter Zusammenhang zwischen hautreizender Wirkung und Hemmung der Prostaglandinsynthese scheint demnach nicht zu bestehen. Für hautreizende Verbindungen ist in der Literatur als Wirkungsmechanismus der "Counter-irritant-Effekt" beschrieben worden (87,88,89,90): Durch Hautreizung werden z.T. über kutiviszerale Reflexe endogen körpereigene Substanzen (z.B. Nebennierenrindenhormone) freigesetzt, die auf humoralem Wege in das Entzündungsgeschehen einer örtlich ferngelegenen Körperregion eingreifen können.

5.4 Sesquiterpenlactone

Sesquiterpenlactone gelten als Wirkprinzipien der in der Phytotherapie bei Rheuma und Arthritis verwendeten Arnikablüten und der in angelsächsischen Ländern ähnlich verwendeten Droge Tanacetum parthenium (91), die auch als "Feverfew" bezeichnet wird.

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine antiinflammatorische Wirkung von Sesquiterpenlactonen (92). In den beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen (Carrageenan-induziertes Rattenpfotenödemmodell) waren Verbindungen mit α -Methylen- γ -lacton-Struktur und einem β -ungesättigten Cyclopentenonring wirksam.

Als möglicher Wirkmechanismus wurde unter anderem auch eine Prostaglandinbiosynthesehemmung diskutiert (93). Wir haben daher einige Sesquiterpenlactone verschiedenener Strukturtypen in unserem Testsystem untersucht und bei 100 μ M praktisch keine Beeinflussung der Prostaglandinbiosynthese gefunden.

Tab. 10:

Sesquiterpenlacton (100 μ M)	Strukturtyp	Beeinflussung *) der Prostaglandinsynthese
Isoalantolacton	Eudesmanolid	+3,4 %
Helenalin	Pseudoguaianolid	0 %
Ambrosin	"	-0,6 %
Psilotropin	"	-0,6 %
Parthenin	"	+6,0 %
Parthenolid	Germacranolid	0 %

*) += Stimulierung ; -= Hemmung; Mittelwerte aus 2 Messungen

Nach diesen Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß für diese Substanzgruppe andere Angriffspunkte als die Prostaglandinsynthase in Frage kommen.

5.5 Salicylsäure und ihre Derivate

5.51 Salix-Inhaltsstoffe

Die in der Weidenrinde aufgefundenen Salicylalkoholderivate werden wegen ihrer Verwandtschaft zur Salicylsäure als "phytotherapeutischer Vorläufer" der Acetylsalicylsäure betrachtet (169,78). Die Droge wird bei fieberhaften Erkrankungen, Grippe, Kopf- oder Entzündungsschmerz angewendet. Dadurch liegt es nahe, auf eine Cyclooxygenasewirkung zu schließen. Außer einem klinischen Erfahrungsbericht (94) aus dem Jahre 1949 liegen keine Arbeiten über den Wirkungsmechanismus vor. Der Hauptinhaltsstoff Salicin wird im Dünndarm zu Salicylalkohol gespalten und dieser Alkohol nach Resorption in der Leber enzymatisch vorwiegend zu Salicylsäure oxidiert (95).

Nach der Entdeckung von VANE (96), daß Acetylsalicylsäure die Cyclooxygenase hemmt, hatte man von der Salicylsäure gleiches angenommen. Weitere Untersuchungen (97) ergaben aber, daß weder Salicylsäure noch ihr Hauptmetabolit Salicursäure in vitro die Cyclooxygenase in ähnlicher Stärke hemmten wie andere NSAIDs.

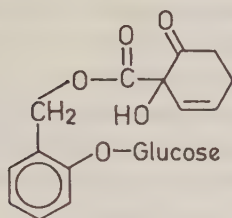
Wir prüften daher, ob möglicherweise die Inhaltsstoffe der Weidenrinde selbst eine solche Wirkung ausüben könnten. Dieser Frage kommt auch im Zusammenhang mit Standardisierungsbemühungen für Salix-Extrakte große Bedeutung zu. Wir untersuchten daher neben zwei Salixextrakten die wichtigsten Salixinhaltsstoffe.

Substanz	Strukturtyp	getestete Konz.
D-Salicin	Phenolglucosid	250 µM
Salicortin	Phenolglucosid	250 µM
Salireposid	Phenolglucosid	250 µM
Isosalipurposid	Chalkon	250 µM
Extrakt von Salix alba	(1,65 % Salicin)	85 µg / ml
Extrakt von Salix purpurea	(10 % Salicin)	≈230 µM

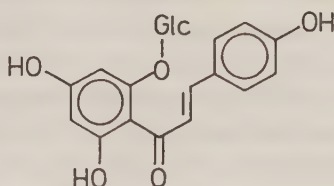
Dabei konnten wir bis zu einer Konzentration von 250 μM keinerlei Einfluß von Salicin, Salicortin, Salireposid bzw. Isosalipurposid auf unser Testsystem feststellen.

Auch zwei Salixextrakte waren in der eingesetzten Konzentration (85 $\mu\text{g/ml} \approx 230 \mu\text{M}$) unwirksam.

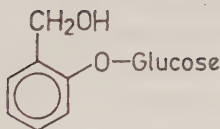
Somit zeigen Salixextrakte und die genuinen Salixinhaltsstoffe genauso wenig eine in-vitro-Prostaglandinsynthesehemmung wie ihre im Organismus gebildeten Hauptmetaboliten.



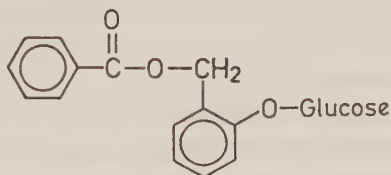
Salicortin



Isosalipurposid



Salicin



Salireposid

Abb. 15: Untersuchte Salix-Inhaltsstoffe

Dennoch besitzt die freie und in der Leber durch Oxidation aus Salicylalkohol gebildete Salicylsäure in vivo eine ähnlich gute antiphlogistische Wirksamkeit wie die Acetylsalicylsäure (98,99,164). VANE u. Mitarb. wiesen erst kürzlich (108) nach, daß nach Gabe von Salicylsäure im entzündeten Gewebe die Prostaglandinspiegel gleichermaßen reduziert werden wie bei Gabe von ASS. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch steht noch aus.

Vermutlich beeinflußt die Salicylsäure die Prostaglandinbiosynthese über einen anderen Angriffspunkt wie z.B. eine ver-

minderte Freisetzung von Arachidonsäure durch Hemmung der Phospholipase A₂.

Für die Standardisierungsbemühungen von Salixextrakten bedeutet dies, daß wie von STICHER und Mitarb. vorgeschlagen (100), eine Standardisierung auf die zu Salicylat metabolisierbaren Inhaltsstoffe vorgenommen werden sollte.

5.52 Weitere Salicylsäurederivate

4-Methoxysalicylsäuremethylester und 5-Methoxysalicylsäuremethylester kommen genuin und in Form ihrer Glykoside (Primverin und Primulaverin) in den Wurzeln von Primula-Arten vor. Für die Droge wurden neben der expectorierenden auch antiexsudative Wirkungen beschrieben (101). Salicylsäuremethylester ist z.B. der Hauptinhaltsstoff des bei rheumatischen Beschwerden häufig verwendeten Wintergrünöls (Oleum Gaultheriae).

Testsubstanz Beeinflussung der Prostaglandinsynthese*)

Salicylsäure	+	4,4 %
Salicylsäuremethylester	-	14,0 %
4-Methoxysalicylsäure	+	7,3 %
5-Methoxysalicylsäure	+	0,4 %
4-Methoxysalicylsäuremethylester	-	51,7 %
5-Methoxysalicylsäuremethylester	-	18,9 %
Acetylsalicylsäure	-	32,7 %

*) - =Hemmung, + =Stimulierung; Mittelwerte aus 2 Messungen
Konzentration der Testsubstanzen: 250 µM

Der 4-Methoxysalicylsäuremethylester zeigte von allen getesteten Verbindungen die stärkste Hemmwirkung und übertraf sogar noch die Acetylsalicylsäure. Die Methylester waren wirksamer als die freien Salicylsäuren, die die Prostaglandinsynthese sogar stimulierten. Im Cyclooxygenaseassay nach Kap. 2.3.2 konnten wir dieses Ergebnis bestätigen und einen IC₅₀-Wert von 100 µM ermitteln.

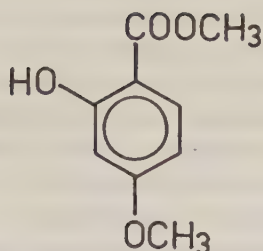


Abb. 16: 4-Methoxysalicylsäuremethylester

Da die Salicylsäure und ihr Methylester in-vivo-Wirksamkeit zeigen (98), sollte nach diesem Screeningergebnis der 4-Methoxysalicylsäuremethylester in einer in-vivo-Testung auf antiinflammatorische Wirkung hin untersucht werden.

5.6 Inhaltsstoffe von Allium sativum

a) Bisherige Untersuchungen:

Neben den Prostaglandinen sind die in Thrombozyten (Thromboxan) bzw. Endothelzellen von Gefäßwänden (Prostacyclin) gebildeten Produkte des Cyclooxygenaseweges biologisch hochaktiv. Sie sind für die Förderung oder Hemmung der Thrombozytenaggregation verantwortlich.

Die Thrombozytenaggregation kann durch Hemmung der Thromboxansynthese oder der Cyclooxygenase in Thrombozyten (Acetylsalicylsäure !) vermindert werden.

Da die Knoblauchinhaltsstoffe immer wieder mit einer Thrombozytenaggregationshemmung in Verbindung gebracht werden, erschien die Untersuchung von Inhaltsstoffen des Knoblauchs (Allium sativum) auch im Cyclooxygenasetest interessant. Die Frage nach den Wirkprinzipien und Wirkmechanismen der Thrombozytenaggregationshemmung wird gegenwärtig mit z.T. divergierenden Aussagen diskutiert:

VANDERHOEK et al. (102,103) fanden für wasserdampfdestillierte Öle neben der aggregationshemmenden Wirkung auch eine Hemmung der Thromboxanbiosynthese. Sie konnten allerdings die wirksa-

men Inhaltsstoffe nicht näher charakterisieren. Nach APITZ-CASTRO et al. (104) besitzen auch die aus methanolischen Knoblauchextrakten isolierten (105) Abbau- bzw. Umlagerungsprodukte des Allicins, das E,Z-Ajoen und die Vinylldithiine, eine thrombozytenaggregationshemmende Wirkung. Bei der Untersuchung des Metabolismus endogener Arachidonsäure in Thrombin-stimulierten Thrombozyten konnten die Autoren allerdings keine Beeinflussung der Cyclooxygenase und der 12-Lipoxygenase nachweisen.

b) Eigene Untersuchungen:

Zur Klärung dieses Sachverhaltes haben wir sowohl die Abbau- produkte des Allicins als auch das Diallyldisulfid als Haupt- inhaltsstoff wasserdampfdestillierter Öle auf eine Beeinflus- sung des Cyclooxygenaseweges im Prostaglandinsynthesetest untersucht.

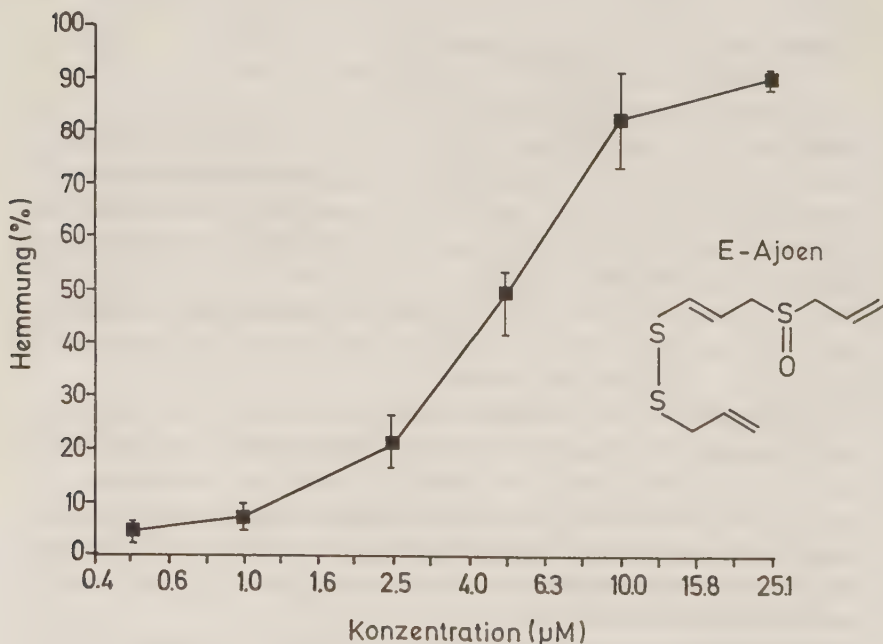


Abb. 17: Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Ajoen (E:Z = 4:1)

Parallel dazu wurde in unserem Arbeitskreis (55) der Einfluß auf die 5-Lipoxygenase von PMNL untersucht.

Neben der Prostaglandinsynthase (Abb. 17) wird auch die 5-Lipoxygenase durch E,Z-Ajoen stark gehemmt: Mit IC₅₀-Werten von 5,1 µM für die Cyclooxygenase bzw. 1,6 µM für die 5-Lipoxygenase liegt das Ajoen im Bereich der IC₅₀-Werte der Referenzinhibitoren: Unter gleichen Bedingungen lag der IC₅₀-Wert von Indomethacin (Prostaglandinsynthase) bei 0,8 µM. Nordihydroguajaretensäure (NDGA) zeigte bei 2,5 µM eine halbmaximale Lipoxygenasehemmung (IC₅₀).

Außerdem untersuchten wir die ebenfalls im MeOH-extrakt vorkommenden Verbindungen 2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin, 3-Vinyl-[4H]-1,2-dithiin, ferner das in Extrakten und im Wasserdampfdestillat enthaltene Diallyldisulfid sowie zusätzlich noch Dimethyldisulfid und Dimethylsulfoxid.

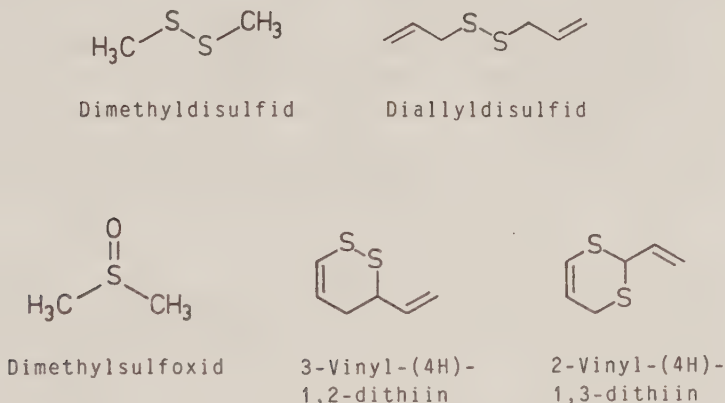


Abb. 18: Untersuchte Knoblauchinhaltsstoffe und andere schwefelhaltige Verbindungen

Außer dem Ajoen wies von den untersuchten Disulfiden nur Diallyldisulfid eine starke Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese auf. Ähnliches galt auch für die 5-Lipoxygenase. Die beiden cyclischen Dithiinverbindungen zeigten in der gewählten Konzentration praktisch keinen Einfluß auf die Prostaglandinsynthase. Der Vergleich Diallyldisulfid - Dimethyldi-

sulfid läßt erkennen, daß die Allylstruktur eine der Voraussetzungen für die Wirkung sein dürfte; allerdings gilt dies nur für die ringoffenen Disulfide. Am Beispiel des Dimethylsulfoxids wird deutlich, daß die Sulfoxidgruppierung nicht zur Wirkung beiträgt. Somit dürfte in erster Linie eine gewisse Strukturähnlichkeit des Ajoens zur Arachidonsäure für die Inhibitoreigenschaften verantwortlich sein.

Tabelle 11: Hemmwirkung verschiedener Knoblauchinhaltsstoffe und weiterer schwefelhaltiger Verbindungen auf die Prostaglandinbiosynthese

Verbindung (50 µM)	PG-Synthasehemmung (%)
E,Z-Ajoen	96.4±0.3
3-Vinyl-[4H]-1,2-dithiin	-
2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin	5.3±3.1
Diallyldisulfid	69.1±6.5
Dimethyldisulfid	8.4±2.8
Dimethylsulfoxid	-

Mittelwerte aus 3 Messungen ±Standardabweichungen

Wir inkubierten menschliche Thrombozyten (nach Kap. 2.4.1) mit 25 µM E/Z-Ajoen, konnten jedoch keine Beeinflussung der Thrombozytencyclooxgenase finden, während unter gleichen Bedingungen 2,5 µM Indomethacin oder 50 µM Acetylsalicylsäure die Bildung der Cyclooxygenaseprodukte HHT und Thromboxan B₂ praktisch vollständig hemmten.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem von APITZ-CASTRO (104) und deutet darauf hin, daß E/Z-Ajoen möglicherweise schlechte Penetrationseigenschaften durch die Thrombozytenmembran aufweist. Auf die Thrombozytenaggregation dürfte das Ajoen daher zumindest über den Cyclooxygenaseweg keinen Einfluß haben.

Nimmt man andererseits die Hemmung der 5-Lipoxygenase in intakten PMNL hinzu, so könnte Ajoen als dualer Enzyminhibitor (Prostaglandinsynthase und 5-Lipoxygenase) für die Therapie entzündlicher Erkrankungen von Interesse sein. Dazu sollten daher noch Prostaglandinbiosyntheseuntersuchungen mit intakten Zellsystemen (z.B. PMNL) durchgeführt werden.

5.7 Cucurbitacine und Naphthochinone

Wir untersuchten die Cucurbitacine I (75 μM) und D (70 μM), die in den bei Rheuma und Arthritis verwendeten Drogen Bryoniae Radix und Tayuyae Radix vorkommen (106), konnten jedoch keine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese feststellen.

Nachdem WURM et al. (63,64) bei einigen Naphthochinonen eine Hemmung der Prostaglandinsynthase festgestellt hatten (Konz.: 1 mM), untersuchten wir aus dieser Stoffklasse Plumbagin und Lapachol sowie das in unserem Arbeitskreis isolierte Chlorplumbagin (107) bei einer Konzentration von 100 μM . Wir konnten bei dieser Konzentration keine Hemmung messen. Anders verhielt es sich mit dem prenylierten Naphthochinon Shikonin aus Lithospermum erythrorizon. Für diese Substanz, die auch im Tierexperiment antiinflammatorisch wirkt (173), fanden wir bei 10 μM eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese von 64,8% . Auch für diese Stoffklasse scheint unsere bei anderen Stoffklassen gemachte Beobachtung zu gelten, wonach lipophile Seitenketten die inhibitorische Wirksamkeit wesentlich verbessern können. Zukünftige Screeninguntersuchungen in dieser Stoffklasse sollten sich daher vorwiegend mit prenylierten Naphthochinonen beschäftigen.

6 Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von LEDUM PALUSTRE L.

6.1 Allgemeine Übersicht

6.1.1 Systematik und Verbreitung

Ledum palustre L., eine von 4 Arten der Gattung *Ledum*, gehört zur Familie der Ericaceen. Sein Verbreitungsgebiet umfaßt die nördlichen Teile von Europa, Asien und Amerika. Der deutsche Pflanzename und die botanische Artbezeichnung *palustre* (vom lateinischen *palus* = Sumpf) deutet auf den Standort der Pflanze als Bewohner der nordischen Hochmoore (109,110).



Abb. 19: Habituszeichnung von *Ledum palustre* nach GARCKE (111)
a) Zweigspitze mit Blütenstand; b) Blüte längs;
c) Blütenstand zur Fruchtzeit, d) reife Frucht

6.1.2 Botanische Beschreibung

Der Sumpfporst ist ein 60-120 cm hoher Strauch mit aufrecht-abstehenden Zweigen. Er besitzt kurz gestielte, lineal-lanzettliche Blätter, durchschnittlich 3 cm lang und 0,3 cm breit, von immergrüner, lederartiger Beschaffenheit. Der Blattrand ist ganzrandig, nach unten umgerollt, die Blattoberseite kahl oder spärlich zerstreut drüsig und glänzend; die Blattunterseite ist, wie auch die jungen Zweige, rostbraun und filzig. Die weißen Blüten mit 5 ausgebreiteten Kronenblättern bilden endständige Dolden. Die Früchte sind 5-fächrige, wandspaltige, hängende Kapseln. Blätter und Blüten geben, besonders beim Zerreiben, einen starken, aromatischen und charakteristischen Geruch ab (109,110).

6.1.3 Verwendung und Pharmakologie

Die Hauptanwendungsgebiete der Droge sind

1. Rheuma, Gicht, Arthrosis deformans sowie
2. Husten und Keuchhusten.

Daneben wurde die Droge früher als Diuretikum, Diaphoretikum und Emetikum verwendet.

In der Volksheilkunde wird die Droge zur Wundbehandlung, bei Insektenstichen, als Laktagogum und Abortivum eingesetzt (75,109,112).

In der Homöopathie ist Ledum palustre ein wichtiges Mittel gegen Muskel- und Gelenkrheumatismus, Gicht, Ischias und Insektenstiche (79,80,109).

Ledol, ein aus der Droge isolierter Sesquiterpenalkohol, ist wahrscheinlich für die zentrale Erregung bzw. Lähmungserscheinungen, die bei peroraler Zufuhr hoher Dosen auftreten, verantwortlich. Über eine lokale Reizung des Magen-Darmtraktes kann Ledol Erbrechen auslösen. Das Öl bewirkt eine Verminderung von Bewegungs- und Balancefähigkeit. Vergiftungen kommen nur bei mißbräuchlicher Verwendung der Droge als Abortivum vor (112).

Die größte Bedeutung besitzt die Droge in Finnland und der Sowjetunion. Aus diesen Ländern liegen auch chemische (siehe

Inhaltsstoffe) und pharmakologische Arbeiten vor: so wurde für das etherischen Öl eine signifikante Hemmung des Rattenpfotenödems gefunden (170). Diese Wirkung wurde in einer Terpenfraktion lokalisiert. Die wirksamen Komponenten wurden jedoch nicht weiter charakterisiert.

6.1.4 Bekannte Inhaltsstoffe

Etherisches Öl: Es gibt zahlreiche Untersuchungen (113-117), nach denen Mycren und die Sesquiterpenalkohole Ledol und Palustrol die Hauptkomponenten darstellen. Die Zusammensetzung des Öles in Abhängigkeit von Jahreszeit oder Standort sind ausführlich untersucht (117,118). Durch GC/MS-Analyse des etherischen Öles wurden 80 Komponenten identifiziert (119).

Sterine: Uvaol, Taraxerol, Ursolsäure (120,121)

Flavonoide: Quercetin, Hyperosid (120,122)

3,3',7-Tri-O-methylquercetin, 4',5-Dihydroxy-3,3',5',7-tetramethoxyflavon, 5-Hydroxy-4,7'-dimethoxy-6-methylflavon (120,123)

Cumarine: Umbelliferon, Esculetin, Scopoletin (124),
Fraxetin (120)

Weitere Inhaltsstoffe nach HEGNAUER (125): Catechingerbstoffe, Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Oxalsäure. Das Vorkommen von Arbutin ist unsicher, Spuren von Alkaloiden sowie ein glykosidisch gebundener Aromastoff "Ericinin" wurden gefunden. Als Träger des aromatischen Geruchs wurden verschiedene Triene identifiziert (126).

6.2 Eigene Untersuchungen

6.2.1 Untersuchungen mit dem etherischen Öl

6.2.1.1 Fraktionierung und Test

Zur Gewinnung des etherischen Öles führten wir eine Wasserdampfdestillation mit fein geschnittener Herba-Droge (Handelsware) in einer Neo-Clevenger-Apparatur durch.

Bei den Screeninguntersuchungen mit 7,5 µg Öl/ml Inkubat fanden wir mit 46,6 % eine deutliche Hemmung der Prostaglandinbiosynthese (siehe Kap. 5.2).

Zur weiteren Fraktionierung wählten wir die präparative Dünnschichtchromatographie. Zur Chromatographie wurde das etherische Öl auf Kieselgelfertigplatten mit dem Laufmittelgemisch [L-1] Toluol-Ethylacetat (76:16) eingesetzt.

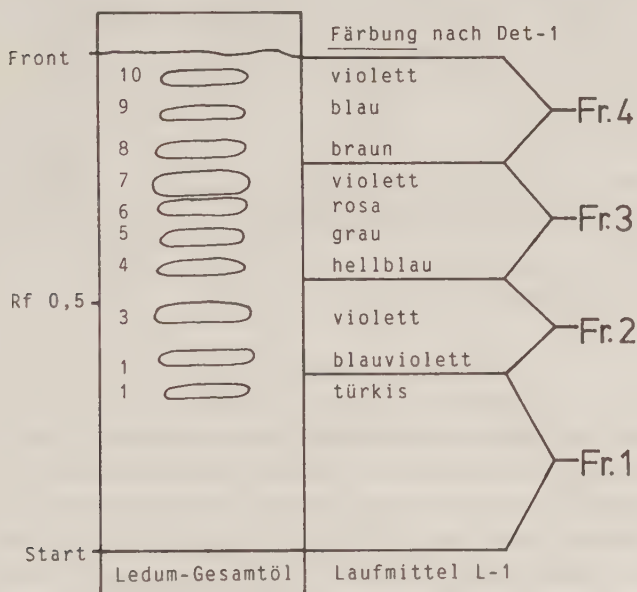


Abb. 20: Fraktionierung des etherischen Öls durch präparative Dünnschichtchromatographie

Es wurden vier Fraktionen (Zone 1-4) in der Konzentration von jeweils 10 µg / 2,635 ml Inkubat im Prostaglandinsynthesetest untersucht. Fraktion 3 bewirkte in dieser Konzentration eine 27,5 %ige Hemmung der Prostaglandinsynthese, während die übrigen 3 Fraktionen in diesem Test inaktiv waren.

6.2.1.2 Identifizierung der wirksamen Komponente

Wir chromatographierten die Fraktion 3 im Laufmittel L-1 und erhielten folgendes DC-Bild:

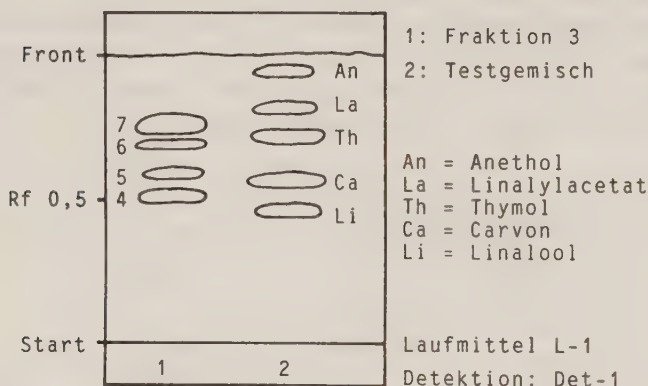


Abb. 21: DC der wirksamen Fraktion 3

Die Komponenten von Fraktion 3 lagen im Rf-Bereich von 0,6-0,75. Von einem mitchromatographierten Testgemisch wies das Thymol einen ähnlichen Rf-Wert auf. Zone 6 ließ sich bei Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure [Det-1] rosa anfärben, war aber im Rf-Wert deutlich von der Vergleichssubstanz Thymol im Testgemisch verschieden. Detektion mit Echtblausalzreagenz [Det-2] deutete durch eine Orangefärbung der Zone 7 auf ein dem Thymol ähnliches Phenol hin.

Wir führten eine gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse der Fraktion 3 durch:

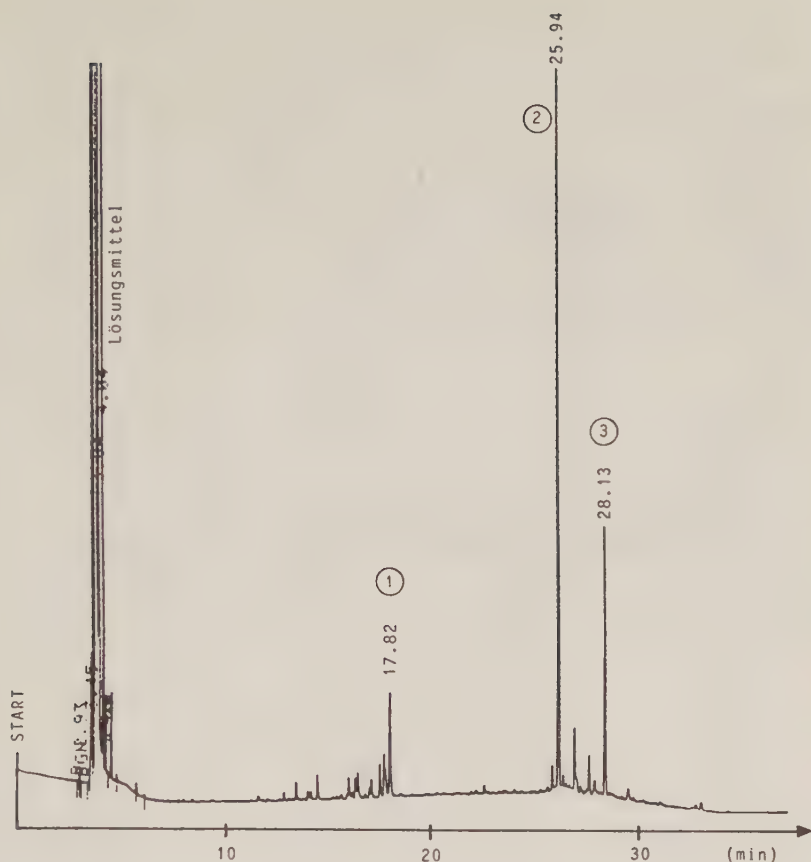


Abb. 22: Gaschromatogramm von Fraktion 3

Aufgrund des Massenspektrums konnte Verbindung 2 als der Sesquiterpenalkohol Palustrol identifiziert werden. Die Fragmentierung war in Übereinstimmung mit Literaturdaten (171). Vom isomeren Ledol (gleiches Molekulargewicht) konnte Palustrol aufgrund des Base-Peaks bei m/z 41 (Ledol: 43) unterschieden werden. Eine spätere Cochromatographie mit authentischer Referenzsubstanz von Ledol bestätigte dieses Ergebnis. Die Verbindung von Peak 3 (M^+ 236) konnte nicht zugeordnet werden.

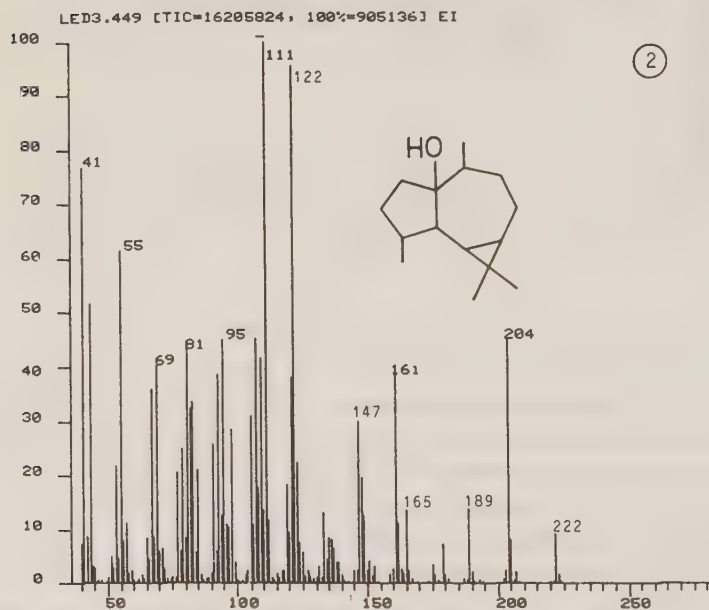
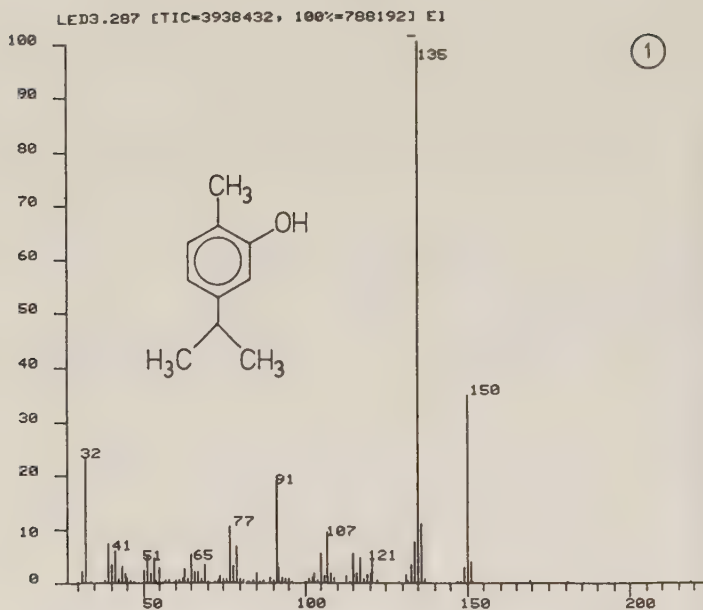


Abb. 23: Massenspektren von Verbindung 1 (Carvacrol)
und Verbindung 2 (Palustrol) [GC/MS]

Für Verbindung 1 fanden wir einen Molekülpeak bei m/z 150. TATTJE und BOS (119) hatten im Ledumöl 9 Verbindungen mit diesem Molekulargewicht nachgewiesen.

Aufgrund des Fragments m/z 77 schlossen wir auf das Vorliegen einer aromatischen Verbindung, so daß nur noch die isomeren Terpenphenole Thymol und Carvacrol in Frage kamen. Da beide Verbindungen massenspektroskopisch nur geringe Intensitätsunterschiede aufweisen, erfolgte die endgültige Zuordnung über die Retentionszeit: Cochromatographie mit beiden Verbindungen (Zuspritzmethode) ergab, daß es sich um Carvacrol handelte.

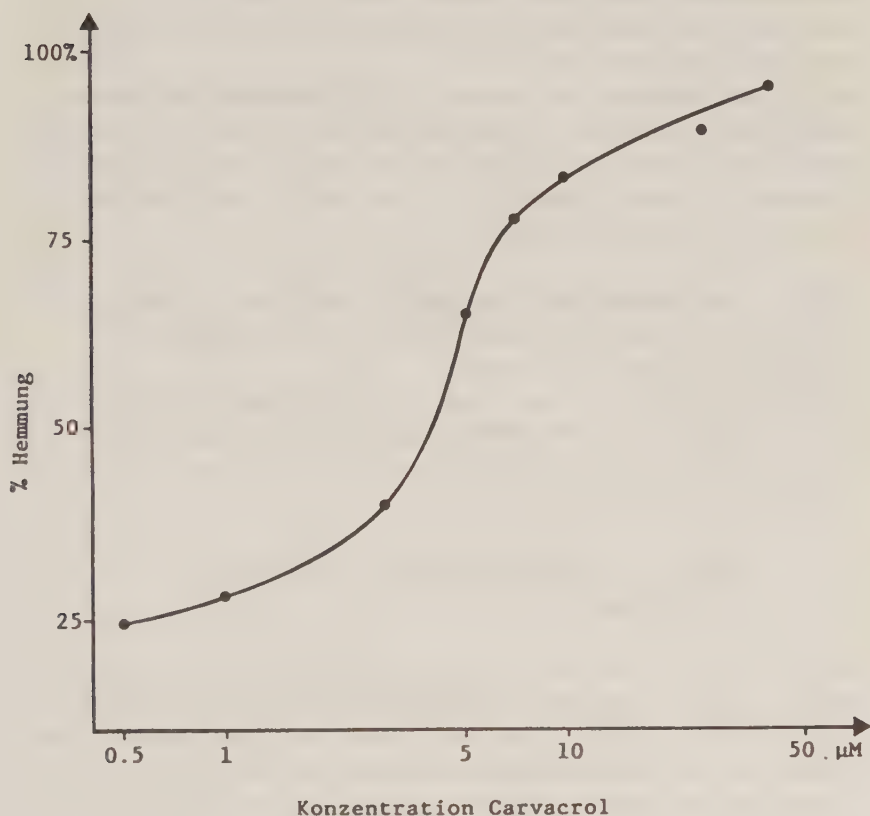


Abb.24: Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Carvacrol

Die beiden uns bekannten Hauptkomponenten wurden einzeln im Prostaglandinsynthesetest untersucht:

während Palustrol in der Konzentration von 50 μM keinerlei Enzymhemmung bewirkte, konnte für das Carvacrol eine starke dosisabhängige Hemmwirkung auf die Prostaglandinbiosynthese gemessen werden.

Wir ermittelten einen IC_{50} -Wert von 4 μM (Abb.24).

Damit gehört Carvacrol ebenso wie einige andere phenolische Verbindungen (siehe Tab. 1) in die Gruppe der am stärksten wirksamen pflanzlichen Inhibitoren der Prostaglandinbiosynthese.

Die gemessene Hemmwirkung dieser Fraktion korreliert gut mit dem Gehalt an Carvacrol (6,8 %; gaschromatographisch bestimmt nach der 100 %-Methode).

Die Hauptkomponente des Ledumöls, der Sesquiterpenalkohol Ledol, den wir dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch in Fraktion 2 lokalisieren konnten, war im Prostaglandinsynthesetest ebenso wie Palustrol bis zu einer Konzentration von 75 μM unwirksam.

Für die Prostaglandinsynthesehemmung des Öles von Ledum palustre dürfte demnach in erster Linie das Terpenphenol Carvacrol verantwortlich sein.

Somit bestätigte sich die schon während unserer Screeninguntersuchungen gemachte Beobachtung, daß Verbindungen mit phenolischer Struktur als wichtige Hemmstoffe der PGS in Frage kommen.

6.2.1.3 Einfluß von Carvacrol auf die Thrombozyten-cyclooxygenase

Detaillierte Untersuchungen mit dem Testmodell nach Kap. 2.3.2 hatten ergeben, daß Carvacrol die Cyclooxygenaseaktivität hemmte und auch in der Lage war, unter gewissen Versuchsbedingungen als Cofaktor der Hydroperoxidase selbst cooxidiert zu werden und die Cyclooxygenaseaktivität zu stimulieren (Kap.3.1 und 3.2). Daher prüften wir die Inhibitoreigenschaften des Carvacrols in weiteren Testsystemen.

Wir wählten die Cyclooxygenase intakter Thrombozyten, um die Wirkung des Carvacrols unter "physiologischen" Bedingungen in Gegenwart der endogenen Cofaktoren messen zu können. Die Untersuchungen wurden in zwei getrennten Testsystemen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen und mittels verschiedenartiger Meßmethodik durchgeführt.

a) Im Testsystem nach Kap. 2.4.1 erhielten wir bei Inkubation menschlicher Thrombozyten mit 50 μM Carvacrol unter Zugabe exogener Arachidonsäure folgendes Metabolitenmuster:

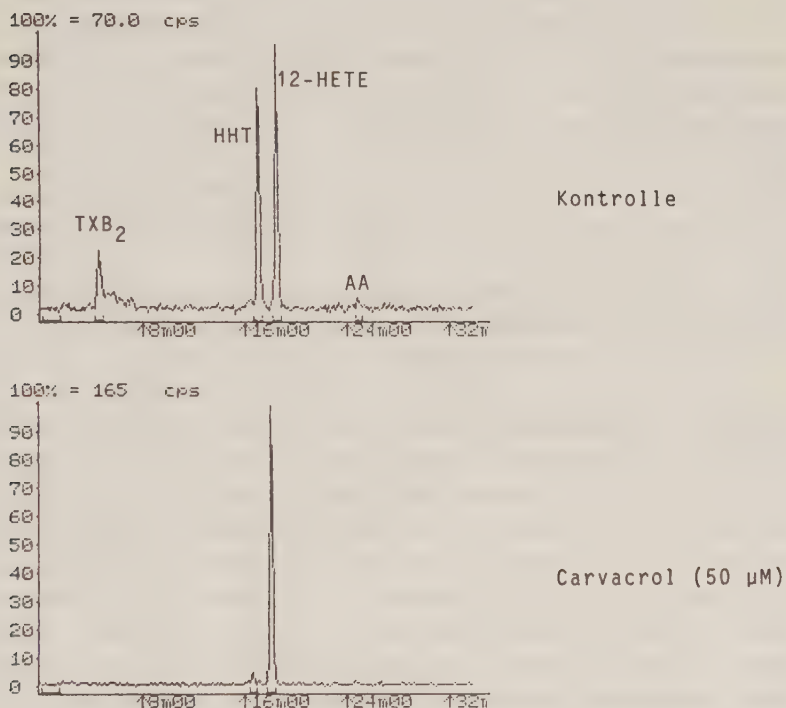


Abb.25: Einfluß von Carvacrol auf den Arachidonsäuremetabolismus von Humanthrombozyten

Während die Cyclooxygenaseprodukte Thromboxan und HHT nicht mehr erkennbar waren, war die Bildung des 12-Lipoxygenaseproduktes 12-HETE stark gesteigert. Offensichtlich führt die Cyclooxygenasehemmung durch einen "Substratshift" zu einer vermehrten Metabolisierung der Arachidonsäure über den 12-Lipoxygenaseweg.

b) Im Testsystem nach Kap. 2.4.2 (Auswertung über RIA) war die Thromboxanbildung in Thrombin-stimulierten Thrombozyten nach Inkubation mit Carvacrol deutlich vermindert:

Konzentration	10^{-4} g/ml	10^{-5} g/ml	10^{-6} g/ml
Acetylsalicylsäure	97,4 %	94,7 %	0 %
Carvacrol	100 %	96,3 %	0 %
Indomethacin	98,2 %	98,3 %	98,5 %

Tab.12: Verminderung der TXB_2 -Konzentration in % nach Inkubation von PRP mit verschiedenen Cyclooxygenaseinhibitoren
(jeweils Mittelwerte aus 2 Messungen)

Ähnlich wie Acetylsalicylsäure hemmt Carvacrol die Thromboxanbildung noch bis zu 10^{-5} g/ml praktisch vollständig. Erst bei 10^{-6} g/l war keine Hemmung mehr meßbar. Beide Substanzen sind schwächere Inhibitoren als Indomethacin, dessen Hemmwirkung erst bei 10^{-7} g/ml meßbar abnimmt (65 % Hemmung). Diese Ergebnisse bestätigen die im Prostaglandinsynthesetest gefundene starke Hemmwirkung von Carvacrol auf die Prostaglandinbiosynthese und die Ergebnisse von Kap.3 bezüglich der Wahl der Versuchsbedingungen. Damit ist die Hemmwirkung von Carvacrol, die im Prostaglandinsynthesetest gefunden wurde, auch unter den Bedingungen eines intakten Zellsystems bewiesen.

6.2.2 Untersuchung des MeOH-Extraktes

6.2.2.1 Phytochemisches Screening

Auf der Suche nach weiteren möglichen Wirkstoffen in *Ledum* haben wir den CHCl_3 - und den MeOH-Extrakt der Droge chemisch noch näher untersucht.

Neben zahlreichen Sterinen und Terpenbestandteilen konnten wir dünnstschichtchromatographisch [L-2, Det-1] im CHCl_3 -Extrakt von den beschriebenen Cumarinen nur Scopoletin und in Spuren Fraxetin [Laufmittel L-5] nachweisen. Esculetin war selbst mit der HPLC-Methode [HPLC-L1] nicht nachweisbar.

Bei der Untersuchung des MeOH-Extraktes im Laufmittel L-3 erhielten wir im R_f -Bereich 0,4-0,7 vier im UV-365 nm gelb fluoreszierende Zonen (1-4) sowie drei weitere blau fluoreszierende Zonen bei R_f 0,1-0,4 (A-N).

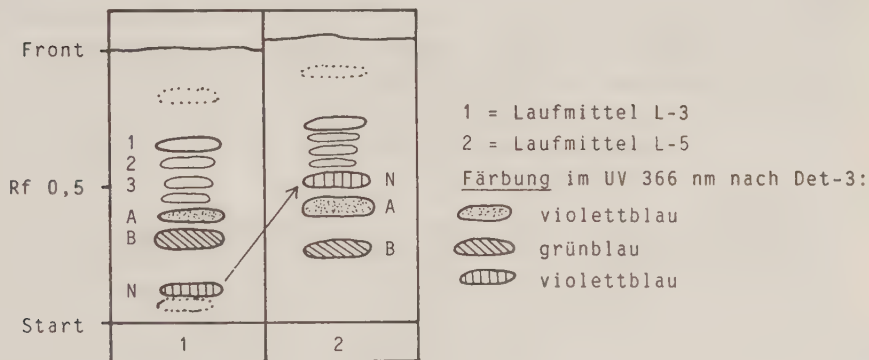


Abb. 26: DC des Methanolextraktes

Detektion mit Naturstoffreagenz [DET-3] lieferte eine intensiv orange Fluoreszenz der Zonen 1-4, was auf das Vorliegen von Flavonoiden schließen ließ. Zone A und N zeigten nach dieser Detektion im UV 365 nm eine violettblaue, Zone B eine grünblaue Fluoreszenz.

Wir vermuteten daher das Vorliegen von Cumarinderivaten. Der Extrakt wurde im Laufmittel L-4 entwickelt. Nach Mikrohydro-

lyse auf der DC-Platte und Chromatographie in eine 2. Richtung [L-7] lieferten die Zonen A, B und N jeweils Zonen mit dem Rf-Wert der D-Glucose.

6.2.2.2 Identifizierung von Zone A (Esculin)

Bei Chromatographie des MeOH-Extraktes an Kieselgel fiel eine Fraktion an, in der die Zone A stark angereichert war. DC-Untersuchungen in den Laufmittelsystemen L-3 und L-4 ergaben im Rf-Wert (0,37 bzw. 0,45) eine Übereinstimmung mit authentischem Esculin. Bestätigt wurde dies durch analytische HPLC-Untersuchung im Laufmittelsystem HPLC-L1: Die Retentionszeiten sowie die on-line aufgenommenen UV-Spektren von Esculin und Zone A stimmten völlig überein.

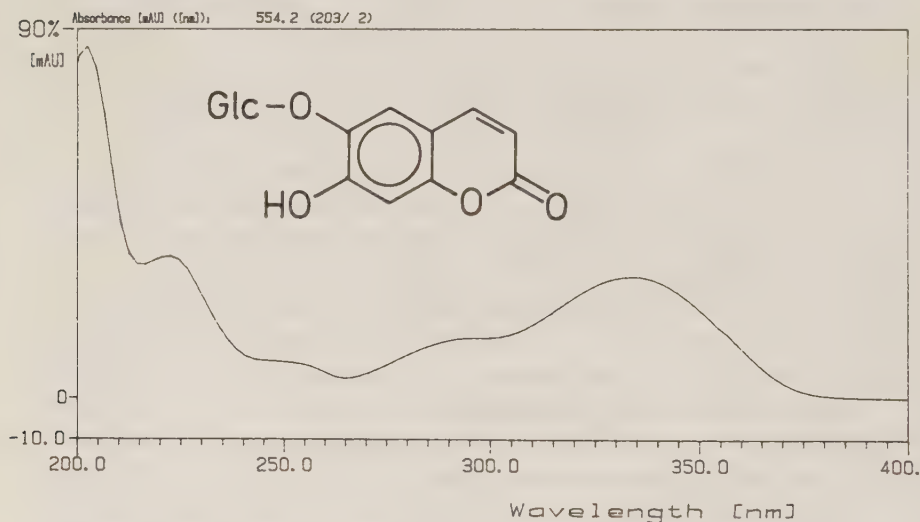


Abb. 27: on-line registriertes UV-Spektrum von Zone A

Nach Mikrohydrolyse auf der DC-Platte konnten wir als Aglykon Esculetin [Laufmittel L-6] nachweisen. Somit war die Zone A als Cumaringlucosid Esculin identifiziert.

6.2.2.3 Isolierung von Zone B

Nachdem die gepulverte Droge zur Entfernung lipophiler Komponenten am Soxhlet mit Petrolether und mit CHCl_3 extrahiert worden war, stellten wir in gleicher Weise einen MeOH-Extrakt her. Aus dem MeOH-Extrakt konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat-Methanol-Wasser [100:20:10]) eine stark angereicherte Fraktion (Zone B) erhalten werden, aus der nach 24-stündigem Stehenlassen in der Kälte ein zunächst rötlich gefärbtes Pulver ausfiel. Nach Waschen mit eiskaltem Methanol erhielten wir 103 mg weiße Substanz.

6.2.2.4 Strukturaufklärung von Substanz B

6.2.2.4.1 UV- und IR-Spektroskopie

Das UV-Spektrum mit Maxima bei 228 und 340 nm und Inflexionen bei 255 bzw 300 nm deutete auf das Vorliegen eines Cumarins hin. Das IR-Spektrum wies die für α -Pyrone typische $\text{C}=\text{O}$ -Bande bei 1710 cm^{-1} auf. Intensive Banden zwischen 1000 und 1150 cm^{-1} bestätigten das Vorliegen eines Glykosides.

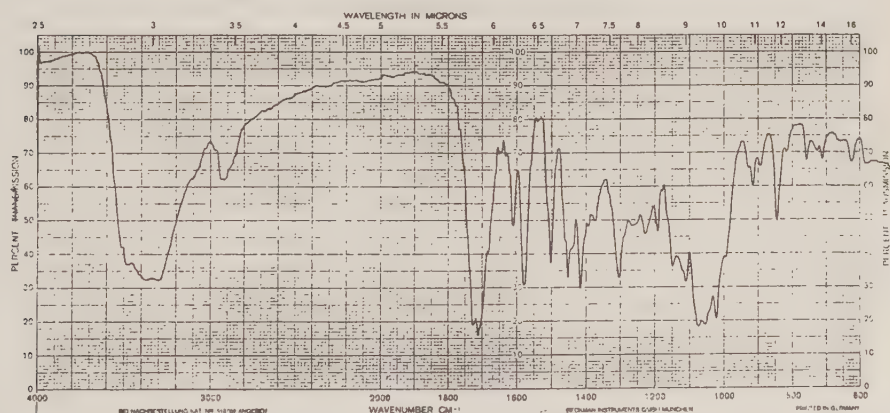


Abb. 28: IR-Spektrum von Substanz B

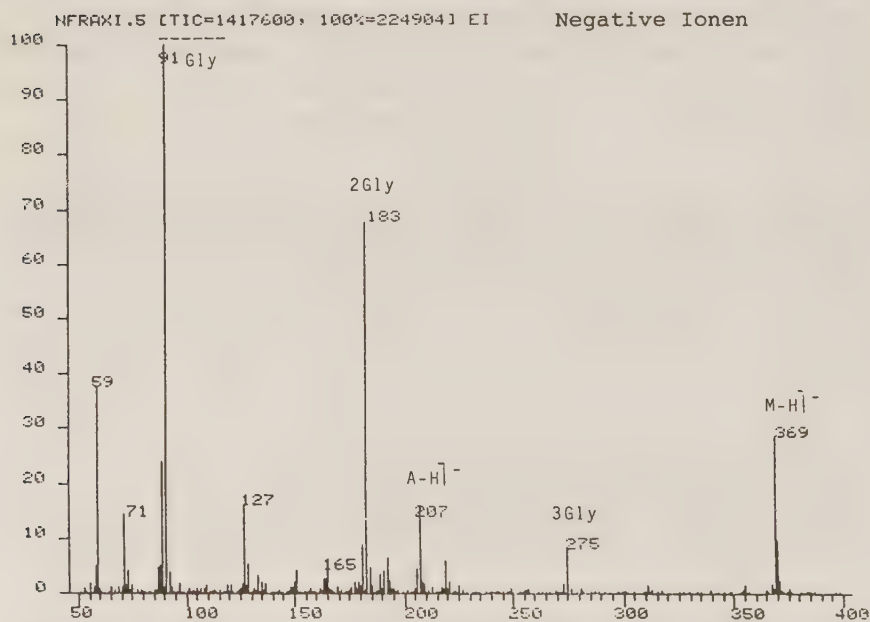
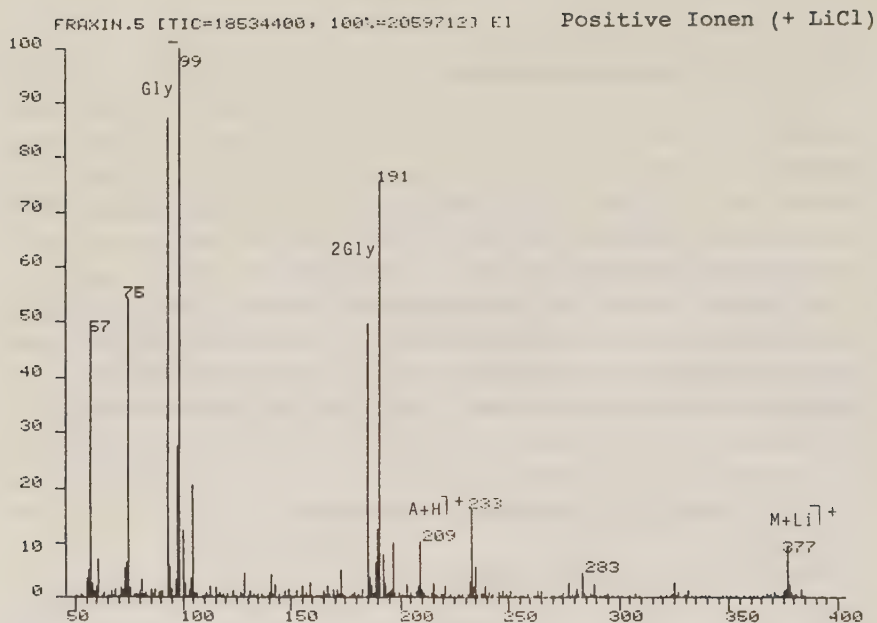


Abb. 29: FAB-Massenspektren von Substanz B

6.2.2.4.2 FAB- und EI-Massenspektroskopie

Um das Massenspektrum des Glykosides unterivatisiert aufnehmen zu können, verwendeten wir die Fast-Atom-Bombardement-Massenspektroskopie (FAB-MS):

Die Aufnahme eines FAB-MS mit Negativionendetektion und eines Spektrums mit Positivionendetektion (unter Zusatz von LiCl) lieferte Pseudomolekülionen bei m/z 369 ($M-H|^-$) und bei m/z 377 ($M+Li|^+$), womit ein Molekulargewicht von 370 bewiesen war. Die Abspaltung einer Hexose lieferte Peaks bei 207 ($M-H|^-$) und 209 ($M+H|^+$). Daher mußte das Aglykon ein Molekulargewicht von 208 aufweisen (vgl. Abb. 29).

Da im FAB-Massenspektrum praktisch keine Fragmentierung des Aglykons beobachtet werden konnte, nahmen wir zusätzlich ein EI-MS (Meßdaten siehe experimenteller Teil) auf. Es lieferte unter thermischer Abspaltung der Hexose einen Base-Peak bei m/z 208 (Aglykon). Der weitere Zerfall (mehrmalige Abspaltung von 28 Masseneinheiten = CO) und Verlust einer Methylgruppe bewiesen das Vorliegen eines Cumarins, das eine methylierte phenolische OH-Gruppe enthalten mußte.

6.2.2.4.3 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Das Protonen-NMR-Spektrum von Substanz B in DMSO- d_6 (mit TFA- d) zeigte bei 6,28 bzw. 7,90 ppm Dubletts für die mit 9.6 Hz koppelnden Protonen H-3 und H-4 (cis-Stellung) des α -Pyronrings. Daneben erhielten wir bei 7,05 ppm ein Singulett für ein aromatisches Proton (H-5) sowie ein 3-Protonen-Singulett (MeO-) bei 3,85 ppm. Im Bereich von 3,1-4,7 ppm waren Signale nachweisbar, die für 6 Protonen einer Hexose integrierten. Das bei 5,0 ppm erscheinende Dublett (H-1') deutete auf das Vorliegen der β -Konfiguration der Hexose hin (vgl. Abb. 30).

Abb. 30: 80 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Substanz B

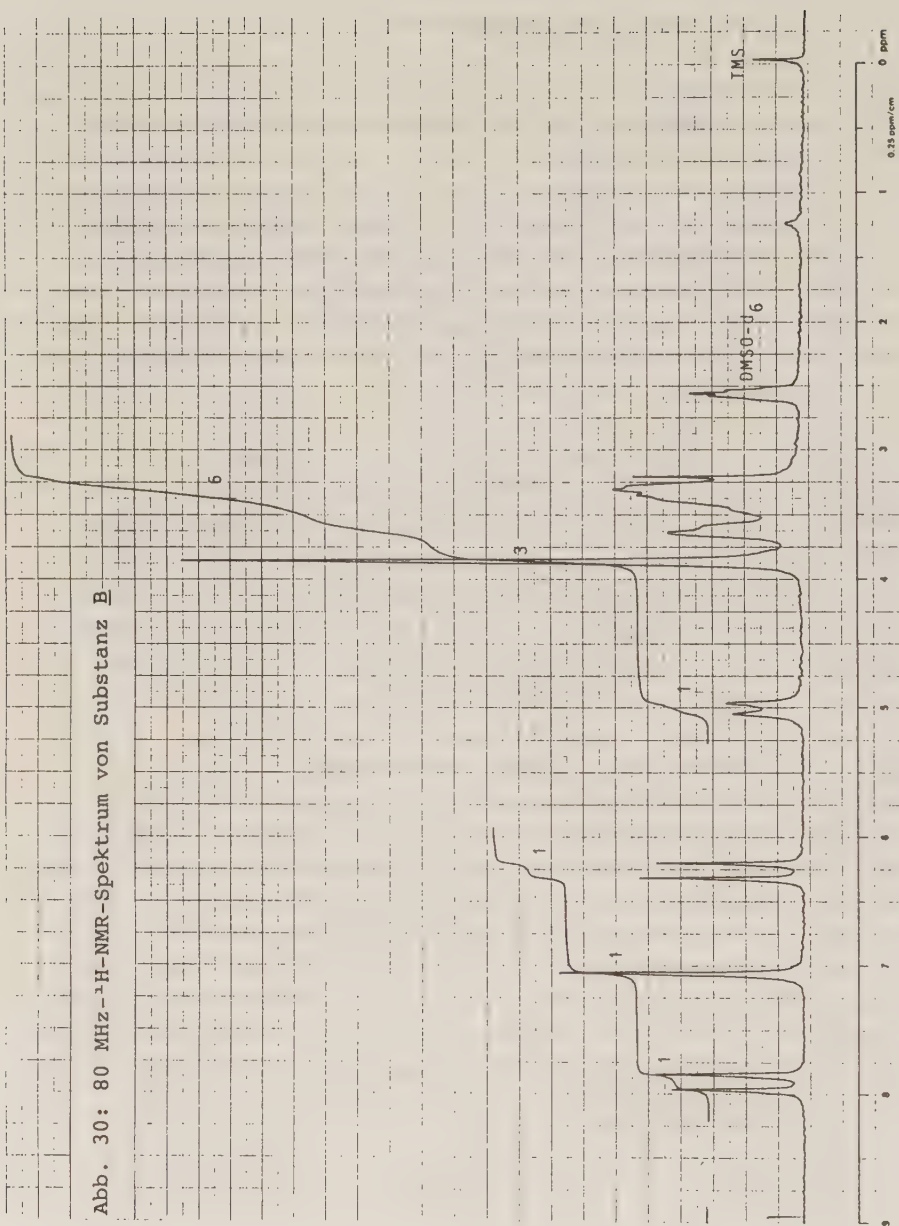
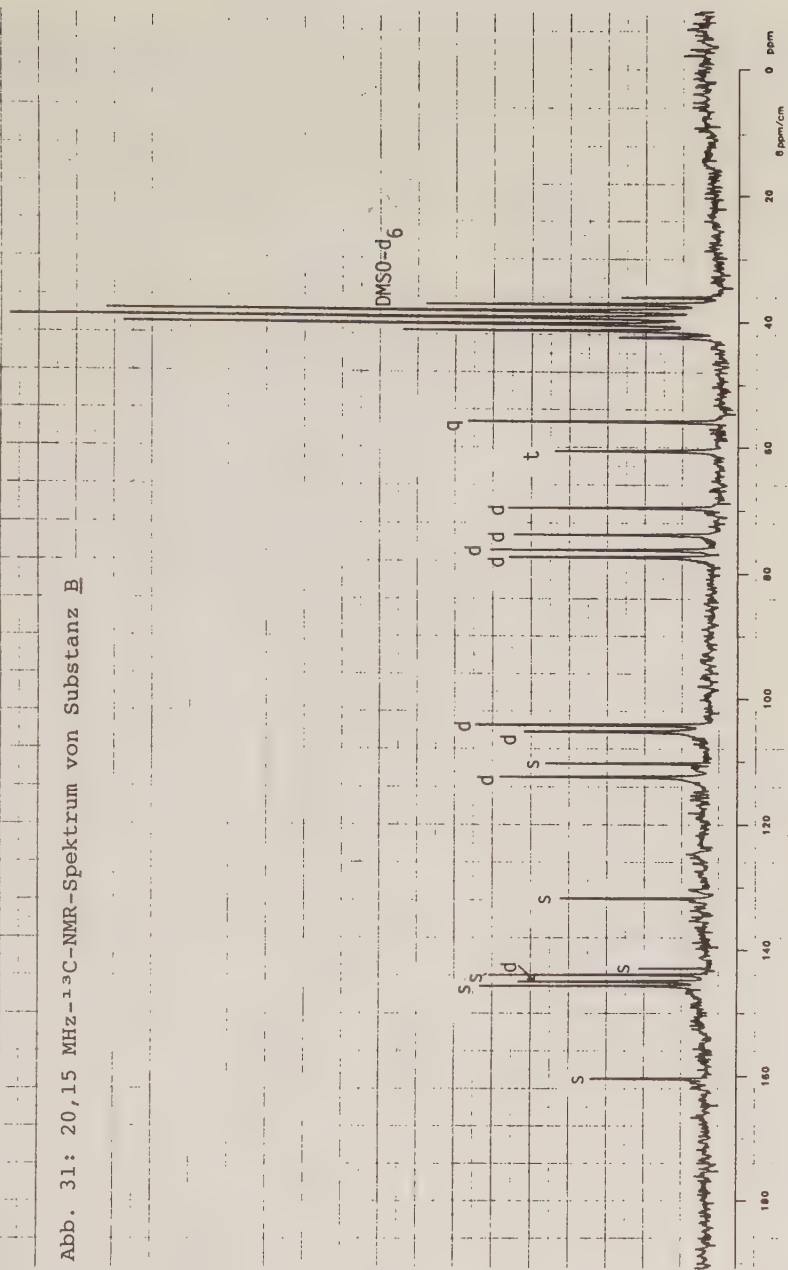


Abb. 31: 20,15 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz B



Die endgültige Identifizierung der Substanz erfolgte durch das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb.31).

Tab.13: Vergleich der ^{13}C -NMR-Verschiebungen (ppm) von Substanz B und Fraxin (127)

Kohlenstoff	<u>B</u> (I)	Fraxin (II)
C-2	160,30 (s)	160,2
3	112,34 (d)	112,2
4	144,82 (d)	144,7
5	105,16 (d)	105,1
6	145,55 (s)	145,4
7	143,81 (s)	143,7
8	131,69 (s)	131,6
9	142,80 (s)	142,7
10	110,27 (s)	110,2
OCH ₃	56,25 (q)	56,1
1'	104,10 (d)	
2'	74,03 (d)	
3'	77,45 (d)+)	*)
4'	69,82 (d)	
5'	76,39 (d)+)	
6'	60,96 (t)	

+) vertauschbar; *) keine Angaben

I) in DMSO-d₆; Bruker WP-80 (20,15 MHz)

II) in DMSO-d₆; JEOL JNM-FX 60 (15,00 MHz)

Die Peakzuordnung erfolgte durch Vergleich mit den Literaturdaten anderer Cumaringlykoside (128).

Eine eindeutige Unterscheidung der Signale von C-3 und C-10 sowie C-4 und C-7 war aufgrund der Multiplizitäten möglich. C-9 ließ sich von C-7 aufgrund der wesentlich geringeren Intensität unterscheiden. Die für das Aglykon gefundenen chemischen Verschiebungen stehen in voller Übereinstimmung mit den von TSUKAMOTO et al. (127) gemessenen Werten. Die Kohlenstoffsignale der Hexose konnten eindeutig einer Glucopyranose

zugeordnet werden. Das bei relativ tiefem Feld (104,1 ppm) erscheinende Signal des anomeren Kohlenstoffs bewies eine β -glykosidische Verknüpfung mit dem Aglykon.

Alle vorliegenden physikalischen und spektroskopischen Daten zeigten, daß Zone B ein

7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin-8- β -D-glucopyranosid, also das bisher nur aus Pflanzen der Familien Oleaceae und Hippocastanaceae isolierte Cumaringlucosid Fraxin war.

Sein Vorkommen in der Ericaceen-Familie und in *Ledum palustre* L. ist neu.

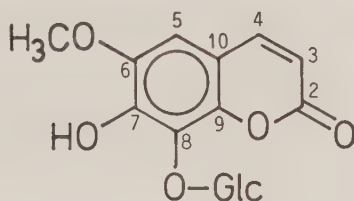


Abb. 32: Fraxin

6.2.2.5 Isolierung von Zone N

Bei der Säulenchromatographie des Methanolextraktes an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat-Methanol-Wasser [100:30:15]) erhielten wir nach Elution der Zonen A und B eine Fraktion, in der die wie Esculin blauviolett fluoreszierende Zone N stark angereichert war. Nach Abtrennung von ausgefallener Saccharose wurde der Überstand durch Mitteldruckchromatographie an reversed-phase-Material im Laufmittel Wasser-Methanol (92:8) weiter gereinigt. Dabei erhielten wir 15 mg Substanz N in reiner Form.

6.2.2.6 Strukturaufklärung von Zone N

6.2.2.6.1 DC-Laufverhalten, UV- und IR-Spektroskopie

Durch Mikrohydrolysen von Substanz N auf der DC-Platte konnten nur Esculetin sowie D-Glucose nachgewiesen werden. Da das UV-Spektrum von Substanz N (Abb. 33) deckungsgleich mit dem von Esculin war, sollte ein Derivat des Esculins mit unverändertem Chromophor vorliegen, in dem ein noch unbekannter Rest am Zucker gebunden vorliegen mußte. Eine Substitution am Aglykon konnte ausgeschlossen werden, da hierbei stets deutliche Veränderungen des UV-Spektrums auftreten.

Bei Chromatographie im Laufmittel L-3 (Abb. 26, S. 69) wies Zone N einen niedrigeren R_f-Wert als die Zonen A (Esculin) und B (Fraxin) auf. Demnach sollte der unbekannte Rest hydrophile Eigenschaften aufweisen. Überraschenderweise erhielten wir aber im "sauren" Laufmittel L-5 für Zone N einen höheren R_f-Wert als für die Zonen A und B. Dieses Laufverhalten war ein Hinweis auf das Vorliegen eines zusätzlichen aciden Restes im Molekül.

Im IR-Spektrum von Substanz N (Abb. 34) war im Vergleich zu Esculin die Carbonylbande verbreitert und lag bei 1730 cm⁻¹. Diese Abweichung wäre mit einer zusätzlich vorhandenen Carboxylgruppe und / oder einer Estergruppierung vereinbar.

File: LEDUM 1
 Date: 06/03/1987
 Spectrum (min): 8.8808
 Reference (min): no
 Attn (mAU): 147.1
 Absorbance (mAU) (nm): 126.1 (203, 2)

hp 1040A

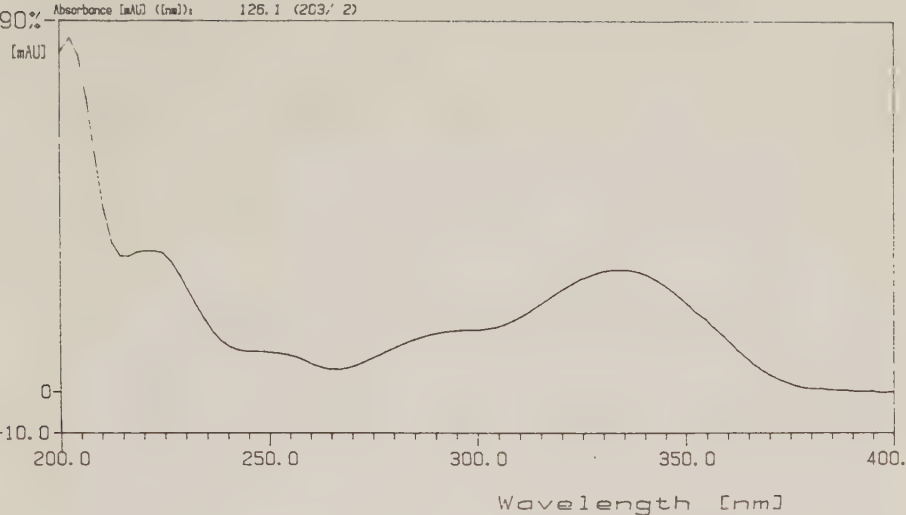


Abb. 33: UV-Spektrum von Substanz N

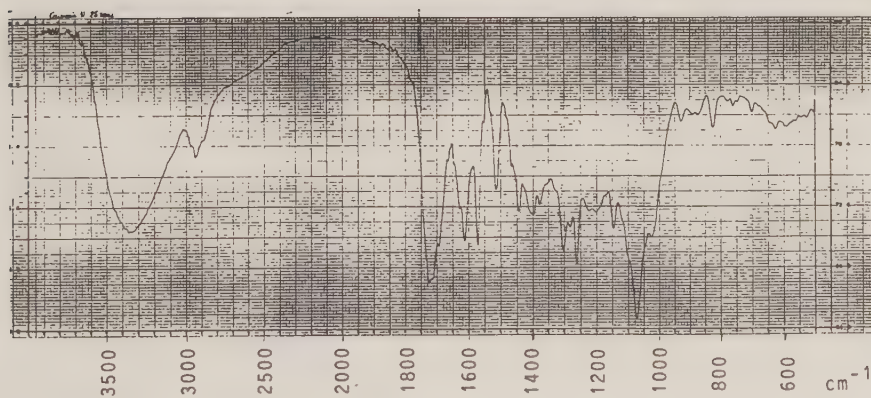


Abb. 34: FT-IR-Spektrum von Substanz N

6.2.2.6.2 Massenspektroskopie

Nach Permethylierung von Substanz N nach der Brimacombe-Methode (129) erhielten wir ein Massenspektrum, das mit dem von permethyliertem Esculin identisch war. Dadurch war das Vorliegen eines Cumarinbiosides auszuschließen. Die einzige Erklärung für dieses Verhalten von Substanz N war, daß der unbekannte Rest unter den Bedingungen der Permethylierung abgespalten worden war.

Durch Aufnahme eines hochaufgelösten FAB-Massenspektrums von Substanz N erhielten wir dagegen für M-H⁻ die Masse 483,1145 (Negativionen-Detektion) und die zugehörige Summenformel $C_{21}H_{23}O_{13}$ (ber.: 483,1139). Das heißt, daß Substanz N ein Molekulargewicht von 484 ($C_{21}H_{24}O_{13}$) und damit ein um 144 Einheiten höheres Molekulargewicht als Esculin besitzt.

6.2.2.6.3 ^1H -NMR-Spektroskopie

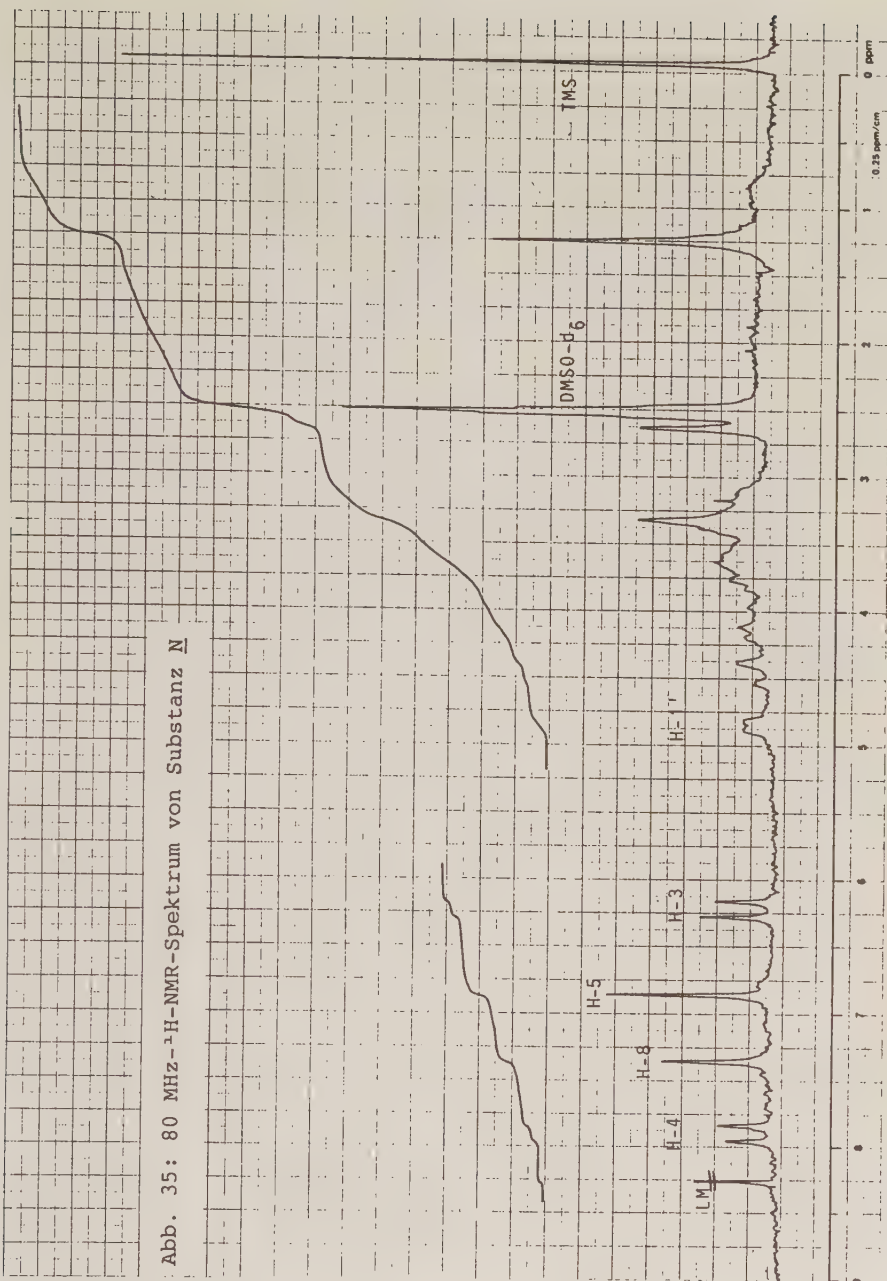
Im ^1H -NMR-Spektrum waren die Signale des Cumarinringgrundgerüsts durch Vergleich mit Esculin leicht zuzuordnen.

Tab.14: Zuordnung der ^1H -NMR-Signale

(ppm)		Zuordnung
4,84	(d _{bx})	H-1'
6,22	(d, 10 Hz)	H-3
6,91	(s)	H-5
7,36	(s)	H-8
7,90	(d, 10 Hz)	H-4

Die Signale im Bereich von 3 - 4,5 ppm waren dem Glucoseanteil zuzurechnen. Das Fehlen eines zweiten anomeren Protons bestätigte erneut, daß kein Cumarinbiosid vorlag. Die Signalzuordnung einiger im 80-MHz- ^1H -NMR-Spektrum verbreiteter Signale gelang durch Aufnahme eines 300-MHz- ^1H -NMR-Spektrums bei 80 °C:

Abb. 35: 80 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Substanz N



Bei 1,29 ppm erhielten wir ein von einer CH_3CO -Gruppierung stammendes Singulett. Das im 80-MHz-Spektrum verbreiterte Signal bei 2,6 ppm erschien im 300-MHz-Spektrum als AB-System (2,65 und 2,60 ppm mit $J=14,4$ Hz), das nach der Integration von einer Methylengruppe stammen mußte. Die Kopplungskonstante von 14,4 Hz lag im für geminal koppelnde Protonen typischen Bereich (12-18 Hz) (130).

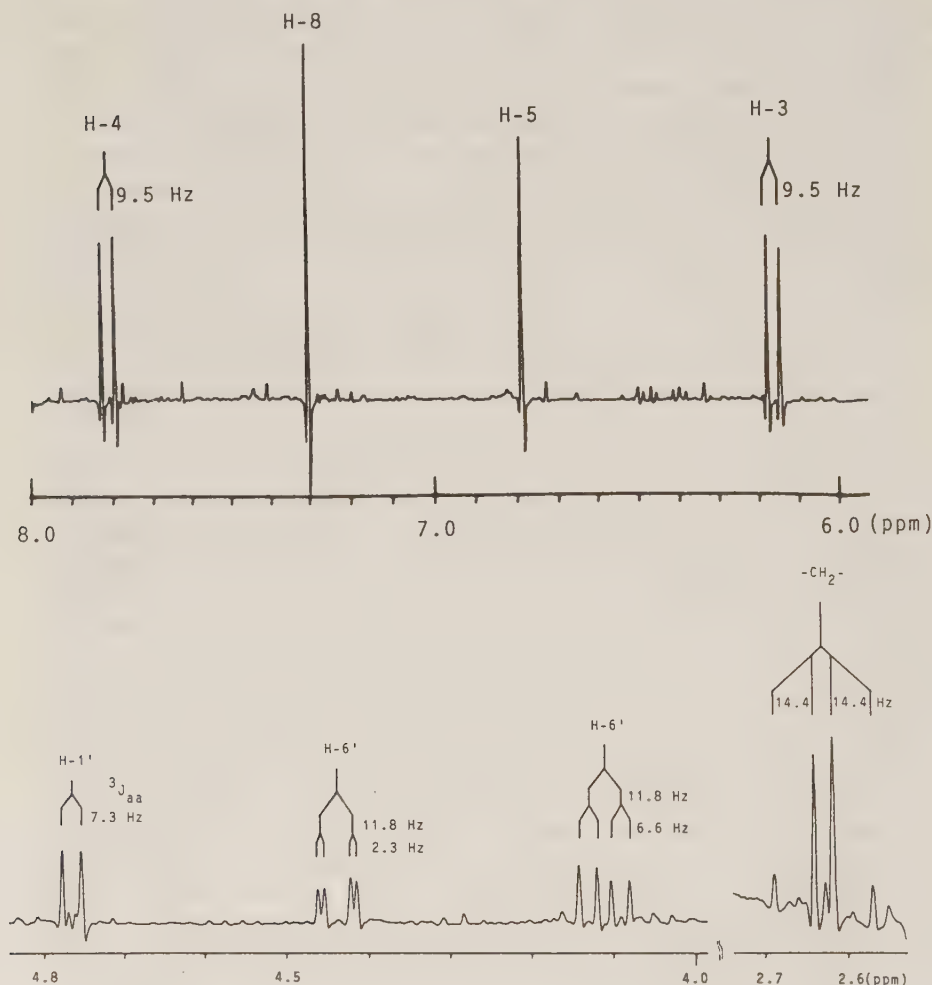


Abb. 36: 300-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Substanz N (Ausschnitte)

Die Nichtäquivalenz dieser geminalen Methylenprotonen legte entweder die Beteiligung an einem Ringsystem oder die Nachbarschaft zu einem asymmetrischen C-Atom nahe.

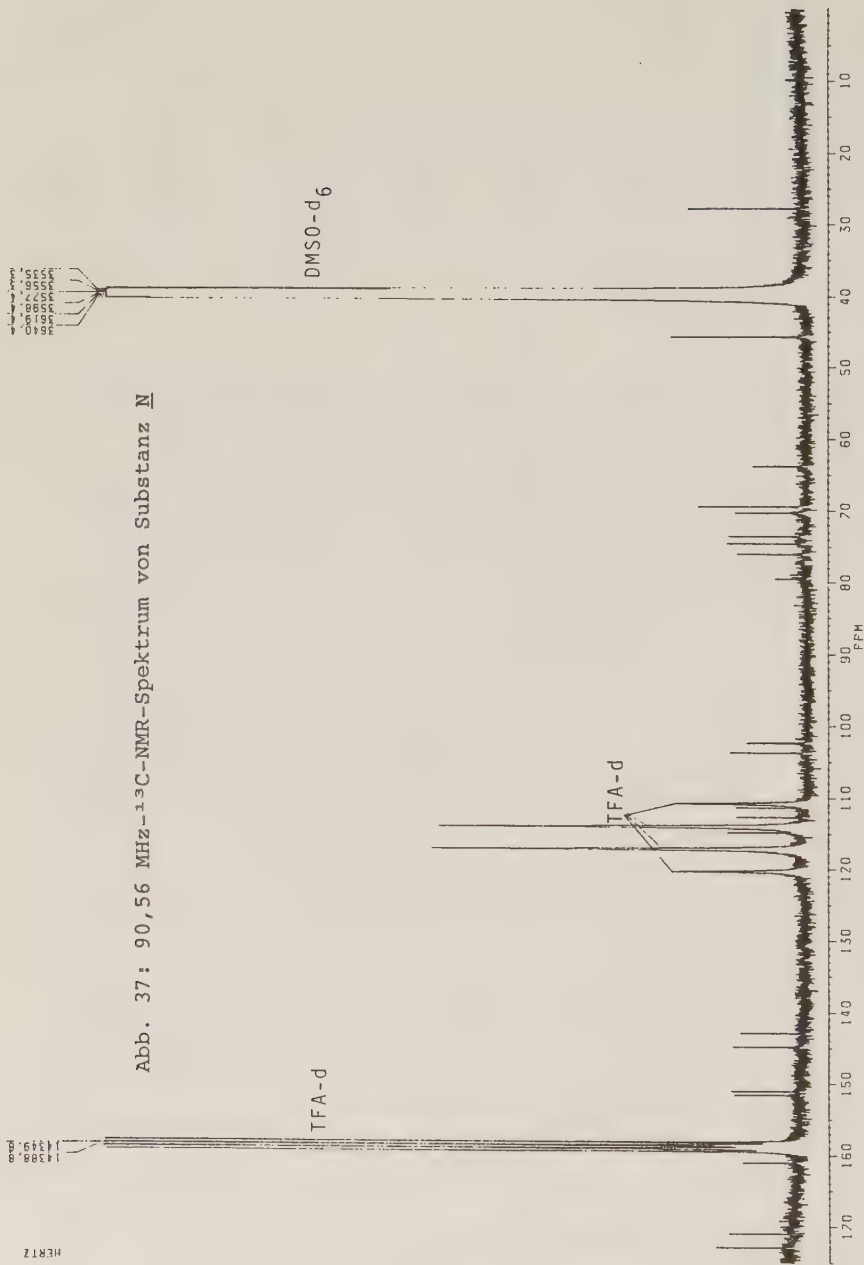
Aufgrund der Summenformel errechneten sich nach WILLIAMS und FLEMING (130) 10 Ring-/Doppelbindungsäquivalente. Da dem zugrunde liegenden Esculin 8 Äquivalente zukommen und im ^{13}C -NMR-Spektrum 2 weitere Carbonylgruppen ermittelt wurden, konnte ein Ringsystem ausgeschlossen werden. Das AB-System war somit einer Methylengruppe zuzuordnen, die einem asymmetrischen C-Atom benachbart ist.

Bei 4,1 ppm ($J = 11,8$ u. $2,3$ Hz) und 4,45 ppm ($J = 11,8$ u. $6,6$ Hz) erschienen Signale, die jeweils in 2 Dubletts aufspalteten. Aufgrund der charakteristischen Kopplungskonstanten wurden sie den Protonen an C-6' zugeordnet. Die Tieffeldverschiebung um $>0,5$ ppm im Vergleich zum Esculin zeigte eine starke Entschirmung beider Protonen und damit eine Substitution an der OH-Gruppe an.

6.2.2.6.4 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die chemischen Verschiebungen der Signale zwischen 100 ppm und 161 ppm decken sich mit den Literaturdaten für Esculin (128,131). Abweichungen waren vor allem im Bereich der Zuckerkohlenstoffsignale zwischen 60 und 80 ppm erkennbar. Insgesamt waren gegenüber Esculin 6 zusätzliche Signale bei 172,8, 170,9, 79,4, 69,3, 45,6 und 28,3 ppm nachweisbar. Dies war in Übereinstimmung mit der massenspektroskopisch ermittelten Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$.

Die beiden Signale >170 ppm können nur von den Carbonylgruppen einer Carbonsäure- und Esterfunktion oder 2 Esterfunktionen stammen. Wir vermuteten daher, daß der Glucoserest mit einer Dicarbonsäure acyliert vorliegen könnte.



In Tab. 15 sind die Signale in ppm von Substanz N und Esculin gegenübergestellt (beide Substanzen in DMSO-d₆ + TFA-d):

Substanz N	Esculin	Zuordnung
172,8	-	C=O
170,9	-	C=O
160,9	161,3	C-2
151,5	152,1	C-7
151,0	151,5	C-9
144,7	144,9	C-4
142,3	143,4	C-6
115,3	115,8	C-5
112,6	112,3	C-3
111,2	111,7	C-10
103,6	104,0	C-8
102,3	103,5	C-1'
79,4	-	quart. C
74,5	78,0 *)	C-5'
75,9	76,7 *)	C-3'
73,4	74,0	C-2'
70,2	70,6	C-4'
69,3	-	CH ₂ OH
63,7	61,5	C-6'
45,6	-	CH ₂
28,3	-	CH ₃

*) Zuordnung kann umgekehrt sein

Die Ermittlung der Acylierungsposition gelang durch Vergleich der Kohlenstoffsignale der Glucose mit den Literaturdaten des Kämpferolacylglucosides Tilirosid und des Phenylbutanonglucosides Lindleyin (132,133). Beide Verbindungen tragen am C-6' der Glucose einen Acylrest.

Tab.16: Lage der ^{13}C -Signale C-6'-acylierter Glykoside (ppm)

	Substanz N	Tilirosid	Lindleyin
C-2'	73,4	74,2	72,8
C-3'	75,9	76,3	76,0
C-4'	70,2	70,0	69,7
C-5'	74,5 (-3,5)	74,2 (-3)	73,5
C-6'	63,7 (+2,2)	63,0 (+2)	63,0

In Klammern sind die Differenzen zum jeweils zugehörigen nicht acylierten Glykosid (Esculin bzw. Kämpferol) angegeben. Die Signale für die Acylierungsstelle an C-6' erfahren in allen Fällen eine deutliche Tieffeldverschiebung, während die benachbarte C-5'-Position eine Hochfeldverschiebung im Vergleich zur nicht substituierten Verbindung aufweist. Andere Acylierungspositionen konnten durch Vergleich mit Literaturwerten (133-136) ausgeschlossen werden.

Substanz N war somit am C-6' acyliert, was auch in Einklang mit den ^1H -NMR-Daten steht.

Für die übrigen Signale ergab sich aus den ^1H -NMR- und anderen Daten folgende Zuordnung:

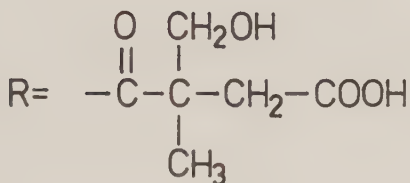
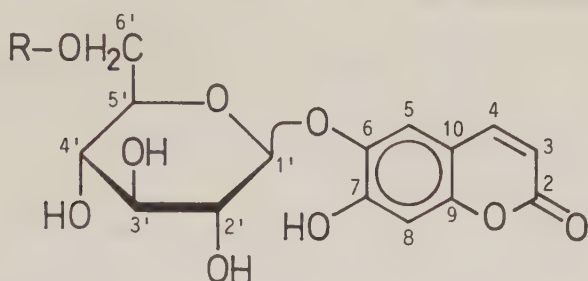
Das bei relativ tiefem Feld erscheinende Signal (79,4 ppm) mit der geringsten Intensität sollte einem quartären Kohlenstoff zukommen. Das Signal bei 45,6 ppm war der Methylen-Gruppe und das Signal bei 28,3 ppm der Methylgruppe der Dicarbonsäure zuzuordnen. Das Signal bei 69,3 ppm sollte der Lage nach von einer CH_2OH -Gruppe stammen.

Demnach sollte Substanz N am C-6' mit einer 2-Hydroxymethyl-2-methyl-butandicarbonsäure acyliert sein.

Ungeklärt waren noch:

1. die Konfiguration am C-2 der Dicarbonsäure (wegen Substanzmangel konnte die optische Drehung noch nicht gemessen werden) und
2. ob die Veresterung am C-1 oder C-4 der Dicarbonsäure vorliegt.

Daraus ergibt sich als Strukturvorschlag für Substanz N folgende Formel, wobei für den Acylrest die beiden nachstehenden Strukturvarianten geschrieben werden können:



oder

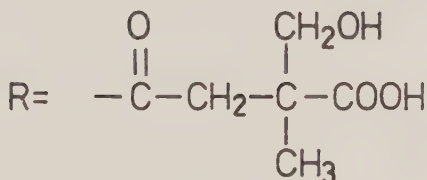


Abb. 38: Strukturvorschlag für Substanz N

Die absolute Konfiguration müßte nach Hydrolyse des Coumarin-acylglykosides und anschließender Veresterung der Dicarbonsäure mit Diazomethan über CD-Messungen zu bestimmen sein. Die Entscheidung über die Veresterungsstelle könnte über SINEPT-NMR-Experimente erfolgen.

Ein Coumaringlykosid mit einer angeknüpften Dicarbonsäure ist bisher nicht beschrieben worden.

6.2.3 Pharmakologische Untersuchungen von Cumarinen (Arachidonsäuremetabolismus)

6.2.3.1 Kenntnisstand

Für das nicht substituierte Cumarin, für 4-Hydroxycumarin und 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) wurde eine Hemmung der Cyclooxygenase der Meerschweinchenlunge bei 1000 μM gefunden (137). Außerdem wurde über eine Hemmung der 5- und 12-Lipoxygenase in Mastocytozellen durch Esculetin ($\text{IC}_{50} = 4$ bzw. 2.5 μM) berichtet (138). Eine japanische Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluß von Esculetin auf Cyclooxygenase und 12-Lipoxygenase aus Rattenthrombozytenhomogenat (139). Weiterhin liegen Daten über den Einfluß verschiedener Cumarine auf Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase von Rattenperitoneal-PMNL-Homogenat vor (140). Mit Esculetin wurde im Konzentrationsbereich >50 μM eine Vermehrung der Cyclooxygenaseprodukte in den verschiedenen Zellhomogenaten beobachtet, während im höheren Konzentrationsbereich (>100 μM) bei Thrombozyten- und PMNL-Homogenat eine Hemmung der Cyclooxygenase gefunden wurde (138-140). Der Mechanismus der Stimulierung der Prostaglandinbiosynthese konnte bisher nicht geklärt werden.

6.2.3.2 Cyclooxygenaseweg in Schafsamenblasenmikrosomen

Für die Dihydroxycumarine Daphnetin, Esculetin und Fraxetin fanden wir im Prostaglandinsynthesetest (mit Adrenalin stimuliertes System) eine zusätzliche Stimulierung der Prostaglandinbildung:

Tab. 17: Stimulierung der Prostaglandinsynthese durch Hydroxycumarine

Daphnetin (40 μM)	+ 27,6 %
Esculetin (40 μM)	+ 8,1 %
Fraxetin (40 μM)	+ 25,2 %
Esculin (100 μM)	--
Fraxin (100 μM)	--

Die im MeOH-Extrakt von *Ledum palustre* aufgefundenen Cumarin-glucoside Esculin und Fraxin waren hingegen bis zu 100 μM ohne Einfluß auf dieses Testsystem.

Bei der Testung von Esculetin im Cyclooxygenasetest (siehe Kap. 2.3.2) beobachteten wir eine starke dosisabhängige Stimulierung der Cyclooxygenaseaktivität.

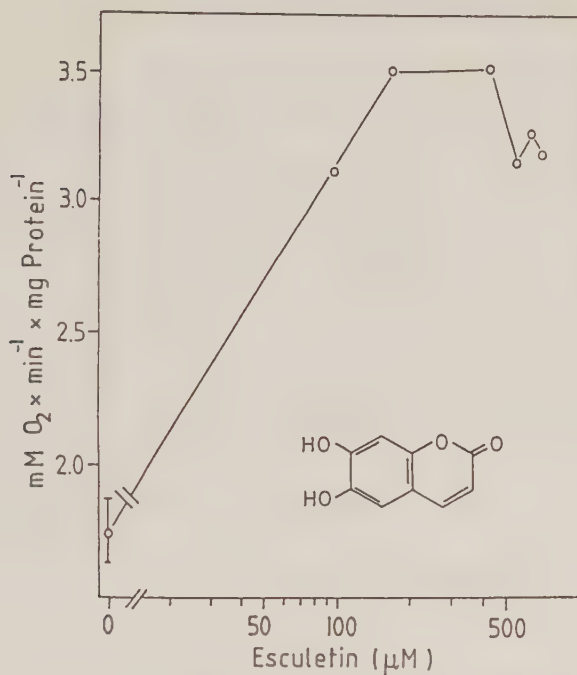


Abb. 39: Stimulierung der Cyclooxygenaseaktivität durch Esculetin

Im Bereich von 150-400 μM erreichte diese Stimulierung mit dem 8,3 fachen des Kontrollwertes ihr Maximum und verminderte sich oberhalb 400 μM etwas, ohne jedoch unter die Grundrate abzufallen.

Unsere Ergebnisse mit Schafsamenblasenmikrosomen korrelieren mit den oben zitierten Arbeiten an Zellhomogenaten. Da starke Stimulatoren der Prostaglandinbiosynthese oftmals auch gute Cosubstrate der Peroxidaseuntereinheit der Prostaglandinsynthase (siehe S.33) sind, untersuchten wir Esculetin im Cooxidationstest nach DEGEN et al. (70).

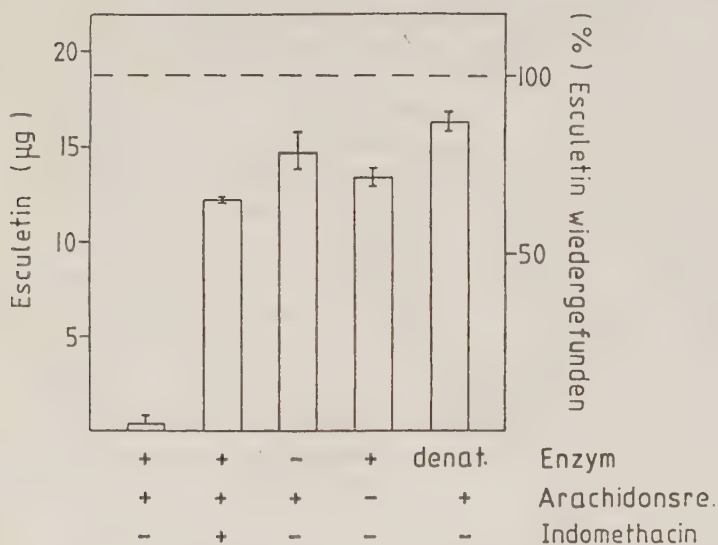


Abb. 40: Cooxidationsexperimente mit Esculetin

Esculetin (56 µM) wurde zusammen mit Schafsamenblasenmikrosomen und Arachidonsäure inkubiert. Nach der Reaktion bestimmten wir mittels HPLC die noch im Ansatz verbliebene Menge an Esculetin:

Im Inkubat war nur noch 1,6 % des ursprünglich eingesetzten Esculetins nachweisbar. Offensichtlich ist Esculetin in der Tat ein ausgezeichnetes Cosubstrat der Peroxidaserreaktion. Es wird praktisch vollständig cooxidiert. In weiteren Reaktionsansätzen konnte demonstriert werden, daß es sich um eine Enzym- und Substrat-abhängige Reaktion handelt, die durch Indomethacin hemmbar war, also eine Folgereaktion der Cyclooxygenierungsreaktion sein mußte.

Dieser Versuch gibt eine Erklärung für die beobachtete Stimulierung durch Esculetin:

Aufgrund seiner ortho-Dihydroxy-Struktur dürfte das Esculetin ähnlich wie das bekannte Cosubstrat Adrenalin zu einem o-Chinon cooxidiert werden und daher die beobachtete starke Stimulierung der Enzymaktivität der Prostaglandin-H-Synthase bewirken.

Versuche zur Produktcharakterisierung sind im Gange.

6.2.3.3 Arachidonsäuremetabolismus in Thrombozyten und PMNL

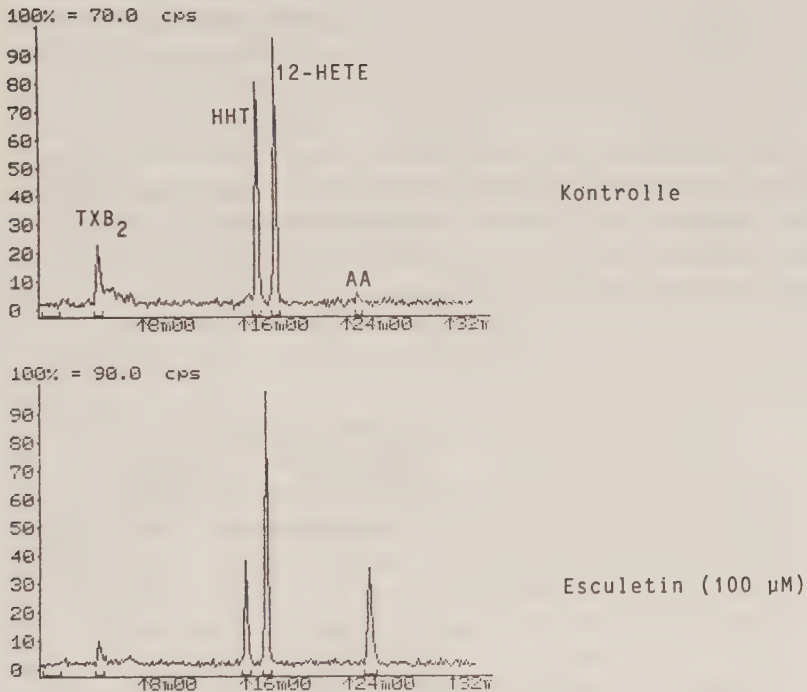


Abb. 41: Einfluß von Esculetin auf die Arachidonsäuremetaboliten in Humanthrombozyten.

Da die Untersuchungen der Literatur mit Zellhomogenaten durchgeführt worden waren, schlossen wir Untersuchungen mit nicht lysierten Zellen an.

a) Thrombozyten:

Inkubation von 100 μM Esculetin mit menschlichen Thrombozyten (nach Kap. 2.4.1) bewirkte eine Verminderung der TXB_2 -Menge bzw. HHT-Menge um 54,3 % bzw. 44,7 %. (Abb. 41)

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Resultaten, die SEKIJA et al. (139) in Versuchen mit lysierten Rattenthrombozyten erhalten hatten. Im Gegensatz zu den Stimulierungen, die Esculetin an der Cyclooxygenase von Schafsamenblasenmikrosomen oder einem Mastocytomzellhomogenat (138) bewirkt, vermindert es bei einer Konzentration von 100 μM deutlich die Bildung von Cyclooxygenaseprodukten in menschlichen Thrombozyten.

b) PMNL: KIMURA et al. (140) hatten eine starke Hemmung der 5-Lipoxygenase von lysierten Ratten-PMNL durch Dihydroxycumarine festgestellt. Wir haben die Dihydroxycumarine im 5-Lipoxygenasetest (Kap. 2.5) mit nicht lysierten Schweineleukozyten untersucht:

Tab.18: Einfluß von Dihydroxycumarinen auf die 5-Lipoxygenase

Substanz / Konz.	Hemmung* der 5-HETE-Bildung	Lit.- IC ₅₀
Daphnetin (20 μM)	4,8 %	1,46 μM
" (40 μM)	31,3 %	
Esculetin (20 μM)	26,9 %	6,90 μM
" (40 μM)	47,8 %	
Fraxetin (20 μM)	24,8 %	2,57 μM
" (40 μM)	32,4 %	

*) Mittelwerte aus 2 Messungen

Alle drei Verbindungen weisen auch unter diesen Bedingungen deutlich 5-Lipoxygenase-inhibierende Eigenschaften auf. Dennoch ist die Hemmwirkung in der intakten Zelle wesentlich schwächer (etwa um den Faktor 50) als im System mit lysierten Zellen. Der Versuch zeigt erneut den gravierenden Einfluß, der von den gewählten Testbedingungen auf das erhaltene Ergebnis ausgeht und die Notwendigkeit zu weitergehenden in-vivo-Untersuchungen.

Gerade im Falle des Esculetins sind interessante therapeutische Perspektiven denkbar:

Der Vergleich der Ergebnisse mit intakten und lysierten Zellen legt den Schluß nahe, daß die Membranen der jeweiligen Zellen eine gewisse Barriere für Esculetin darstellen und daher die Hemmwirkungen abschwächen. Wenn nun beispielsweise gezeigt werden könnte, daß die Cyclooxygenase der Gefäßwände (die an der Biosynthese des Prostacyclins beteiligt ist) für Esculetin leichter zugänglich ist als die Thrombozytencyclooxygenase und es dort analog den Ergebnissen mit Schafsamenblasenmikrosomen bzw. Mastocytomzellen zu einer Stimulierung der Cyclooxygenaseaktivität käme, so könnte es zu einer Verschiebung des Prostacyclin-Thromboxan-Verhältnisses kommen. Für die Behandlung arteriosklerotischer Krankheiten wäre dies von außerordentlichem Interesse.

6.2.4 Diskussion der in Kap. 6.2 erhaltenen Ergebnisse

Das etherische Öl von Ledum palustre wies Prostaglandinsynthese-hemmende Eigenschaften auf. Als für diese Wirkung verantwortlicher Inhaltsstoff wurde das Terpenphenol Carvacrol identifiziert. Durch Untersuchungen in verschiedenen Testsystemen konnten die Hemmstoffeigenschaften des Carvacrols näher charakterisiert werden.

Im Methanolextrakt der Droge wurden 3 bisher nicht beschriebene Cumaringlucoside nachgewiesen und identifiziert bzw. strukturell aufgeklärt.

In den durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen zur Inhibition des Arachidonsäuremetabolismus zeigten die genuin in der Droge vorliegenden Cumaringlucoside keine nennenswerten Aktivitäten. Hingegen erwiesen sich die Aglyka dieser Cumarin-glucoside (Esculetin, Fraxetin) als starke Stimulatoren der Prostaglandinsynthese in Schafsamenblasenmikrosomen. Für das gemeinsame Aglykon von Substanz A und Substanz N, das Esculetin, wurde als Mechanismus dieser Stimulierung eine starke Cooxidierbarkeit durch die Prostaglandinsynthese gefunden. Hingegen hemmte Esculetin die Cyclooxygenase in intakten Humanthrombozyten.

Ebenso konnte gezeigt werden, daß die starke Hemmwirkung der Dihydroxycumarine auf die 5-Lipoxygenase von Zellhomogenaten eine Abschwächung bei Verwendung von nicht lysierten Zellen als Testsystem erfährt. Dennoch stellen die Dihydroxycumarine potente Inhibitoren der 5-Lipoxygenase dar, die für die Behandlung allergisch-entzündlicher Erkrankungen von Interesse sein dürften.

Der Methanolextrakt von *Ledum palustre* enthält somit in den Cumaringlucosiden Esculin, Fraxin und dem Cumarin-acylglykosid N ein erhebliches Potential an Vorstufen der biologisch hochaktiven Dihydroxycumarine (Esculetin und Fraxetin), die nach Hydrolyse im Gastrointestinaltrakt ihre Wirkung entfalten könnten. Aufgrund der durchgeführten Experimente erscheint es sinnvoll, die unterschiedliche Wirkungsweise der Dihydroxycumarine in verschiedenen Kompartimenten des Organismus eingehender zu untersuchen. Tierexperimentelle Untersuchungen müssen zeigen, ob und inwieweit aus den verschiedenen Einzelwirkungen eine antiphlogistische Gesamtwirkung resultiert.

7 Phytochemische und pharmakologische Untersuchung von Toxicodendron radicans (L.) KUNTZE (Rhus toxicodendron)

7.1 Allgemeine Übersicht

7.1.1 Systematik und Verbreitung

Die Gattung Toxicodendron gehört zur Familie der Anacardiaceae. Die Systematik dieser Gattung war lange Zeit umstritten. Eine ausführliche Behandlung dieser Problematik findet sich bei GILLIS (141), dessen Einteilung inzwischen weitgehend akzeptiert ist.

Die wichtigsten Arten dieser Gattung sind:

Toxicodendron radicans und T. rydbergii (poison ivy), T. diversilobum (western poison oak), Toxicodendron toxicarium (eastern poison oak) und T. vernix (poison sumac). Die anhaltende Unsicherheit in der botanischen Zuordnungen dieser Gattung brachte es mit sich, daß für die in dieser Arbeit untersuchte Art Toxicodendron radicans auch viele andere Bezeichnungen wie Rhus radicans L. oder Rhus toxicodendron L. gebraucht wurden, die gleichzeitig auch für Vertreter anderer Arten benutzt wurden.

Toxicodendron radicans ist vor allem im Osten Nordamerikas weit verbreitet und bevorzugt trockene Standorte. Daneben kommen einige Subspezies in Nordostasien vor (141,142).

7.1.2 Botanische Beschreibung

Toxicodendron radicans ist ein bis zu 1 m hoher Strauch, der 3-zählige Laubblätter zumeist ganzrandig und von eiförmig-lanzettlicher Gestalt besitzt. Die weißlich-grünen Blüten stehen in reich behaarten achselständigen Rispen. Die grüngelben Früchte können behaart, unbehaart oder papillös sein. Die Behaarung der meist ganzrandigen Blätter variiert je nach Subspezies (141,142).

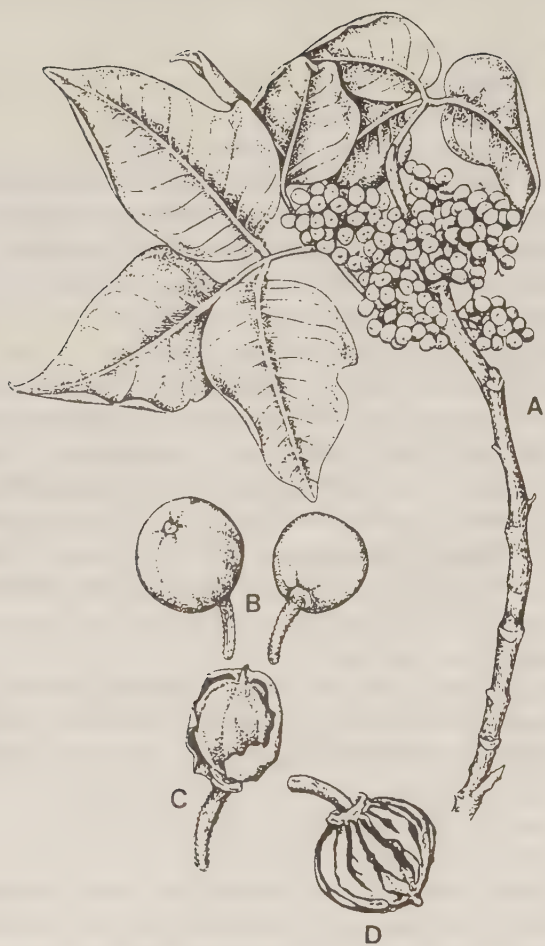


Abb. 42: *Toxicodendron radicans* nach GILLIS (141)

A: Habitus (x 0,75); B: ganze Frucht

C,D: Exokarp z.T. bzw. vollständig entfernt

7.1.3 Verwendung

Unter der Bezeichnung *Rhus toxicodendron* werden in der Homöopathie Toxicodendronextrakte als wichtiges Basismittel bei akutem wie subakutem Gelenkrheumatismus, Muskelrheumatismus, Neuritiden und Neuralgien verwendet. Als weitere Anwendungsgebiete werden Lumbago, Torticollis und bestimmte Hauterkrankungen genannt (79,80).

Die "Pharmazeutische Stoffliste" (143) verzeichnet 41 Präparate mit Zubereitungen von *Rhus toxicodendron*. Zur topischen Anwendung wird zumeist die Urtinktur verwendet, zur innerlichen Anwendung kommen stets homöopathische Dilutionen.

Für *Rhus toxicodendron* bestehen Monographien im HAB 1934 und im Erg.B.6 (Droge und Tinktur).

7.1.4 Rhus-Allergien

Bei einem großen Teil der nordamerikanischen Bevölkerung besteht eine Kontaktallergie gegenüber Toxicodendron-Arten, für die in zahlreichen Untersuchungen die Urushiole verantwortlich gemacht werden (144,145). Es handelt sich dabei um eine T-Lymphozyten-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (146,147). Inzwischen sind einige Versuche unternommen worden, um durch Gabe geringer Mengen verwandter Verbindungen (Pentadecylcatecholderivate) eine Immunität gegenüber Urushiol zu erzeugen (148,149,150).

7.1.5 Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Die Beschäftigung mit den Inhaltsstoffen von Toxicodendron radicans erstreckte sich im wesentlichen auf das "toxische Prinzip" Urushiol, einem Gemisch von Catechol-Verbindungen mit gesättigten und Mono-, Di- und Tri-ungesättigten C₁₅- und C₁₇-Seitenketten (145,151-155).

Außerdem wurden zwei auch in anderen Anacardiaceae-Arten bekannte Biflavonoide, Amentoflavin und 3',8''-Binaringenin, isoliert (156). Weiterhin ist das Vorkommen von Fisetin (im

Kernholz), Gallusgerbstoffen und Rhamnose bekannt (75). Für die Früchte ist das Vorkommen von Heneicosandicarbonsäure (157) und einigen weit verbreiteten Fettsäuren (158) beschrieben.

7.2 Eigene Untersuchungen

Wegen der großen Bedeutung in der Homöopathie unternahmen wir Screeningversuche mit einer homöopathischen Urtinktur. Da die hier verwendete Nomenklatur "Rhus toxicodendron" keine sicheren Rückschlüsse auf das zur Extraktion verwendete Drogenmaterial zuließ, verglichen wir die chemische Zusammensetzung mit der einer nach GILLIS (141) bestimmten Pflanze des Botanischen Gartens: es handelte sich um *Toxicodendron radicans*.

7.2.1 Pharmakologisches Screening und Fraktionierung

Erste Screeningversuche mit einer *Toxicodendron*-Urtinktur, die nach HAB 1934 durch 8 bis 14-tägige Mazeration mit 60 % EtOH hergestellt wird, führten bei 750 µg Trockenextrakt / ml Inkubat *) zu einer völligen Hemmung der Prostaglandinsynthese. Auch homöopathische Dilutionen dieser Urtinktur D1 und D2 (entsprechend Verdünnungen von 1:10 bzw 1:50) zeigten noch eine Hemmwirkung von 43,1 % bzw 37,5 %. Dieses Ergebnis veranlaßte uns, diesen Extrakt phytochemisch und pharmkologisch weiter zu untersuchen.

Die Urtinktur wurde 1:1 mit Wasser verdünnt und sukzessive mit Chloroform, Ethylacetat und wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt. Die auf diese Weise gewonnenen Fraktionen wurden zur Trockne eingeengt.

Da die Urtinktur in der ursprünglich getesteten Konzentration zur völligen Enzymhemmung führte, setzten wir nun die Fraktionen in sehr niedriger Konzentration (20 µg/ml) ein.

*) Screeningkonzentration nach SANKAWA und Mitarb. (15)

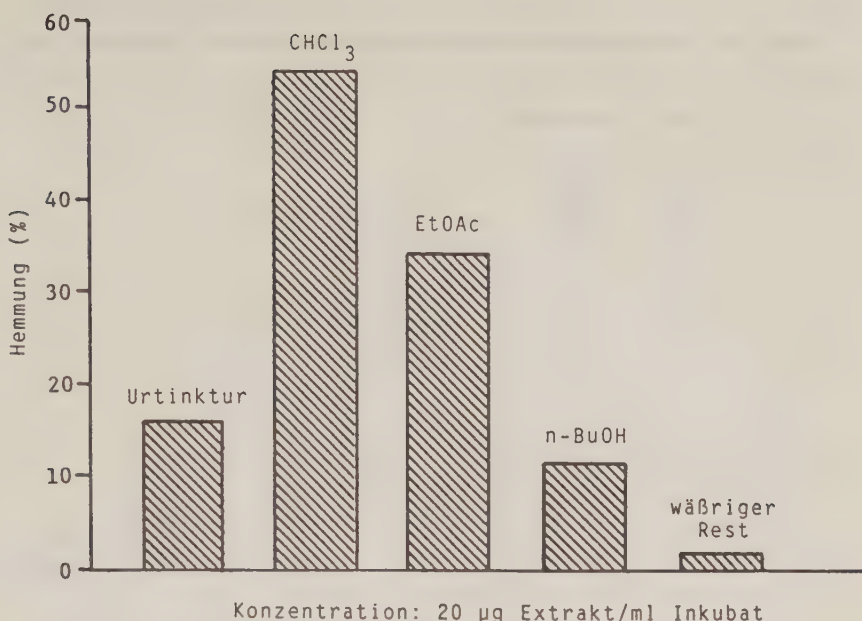


Abb. 43: Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Urtinktur und Fraktionen der *Rhus toxicodendron*-Urtinktur

Die stärkste Hemmwirkung auf die Prostaglandinsynthese zeigten die Chloroform- und die Ethylacetatfraktion, während der wäßrige Rest praktisch unwirksam war.

7.2.2 Untersuchung der Chloroformfraktion:

7.2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Zur näheren Charakterisierung der CHCl₃-Fraktion chromatographierten wir diese in 3 verschiedenen Laufmittelsystemen [T-1, T-2, T-3]. Wir detektierten zunächst mit FeCl₃-Lösung [Det-4]. Das Chromatogramm wies im LM-T1 1 blaue und 2 bräunlich-schwarz gefärbte Zonen im R_f-Bereich von 0,5-0,7 auf. Das Urushiol-Referenzgemisch lieferte ebenfalls bräunlich-schwarz

anfärbbare Zonen im gleichen Rf-Bereich. Da die Zonen keine eindeutige Übereinstimmung in den Rf-Werten ergab, führten wir eine HPLC-Untersuchung durch.

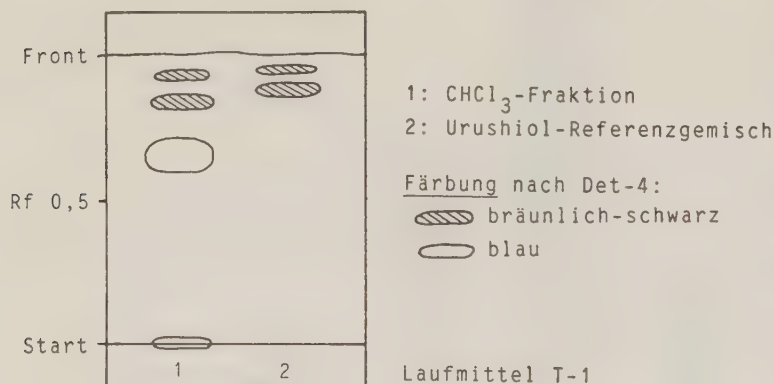


Abb.44: DC der Chloroformfraktion

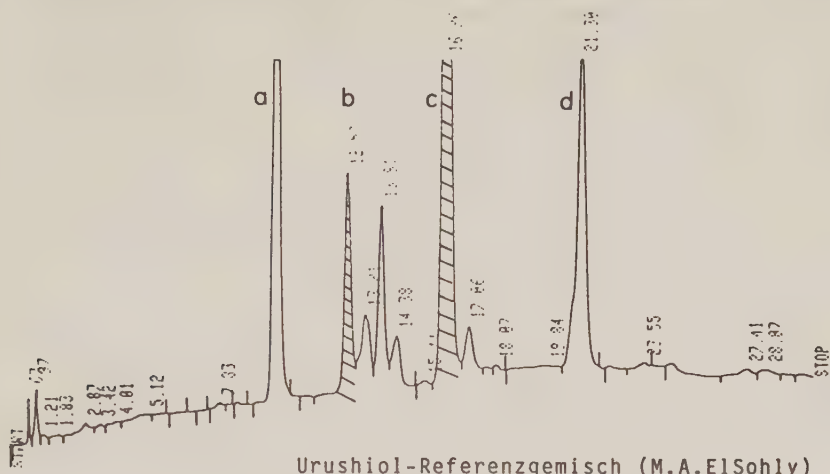
7.2.2.2 HPLC-Untersuchung

Bei der Untersuchung des polareren Bereichs der Fraktion mit einem Acetonitril-Wasser-Gradientensystem von 3-40% Acetonitril in 30 min (unter Zusatz von 1% 0,1 N H_3PO_4 = HPLC-T1) erhielten wir nur einen Hauptpeak mit $R_t = 13.23$ min. Dieser wies ein UV-Spektrum mit Maxima bei 217 und 273 nm auf. Der Vergleich von Retentionszeit und UV-Spektrum mit authentischem Gallussäureethylester ergab eine völlige Übereinstimmung. Damit konnte Zone 1 des Dünnschichtchromatogramms endgültig dem Gallussäureethylester zugeordnet werden.

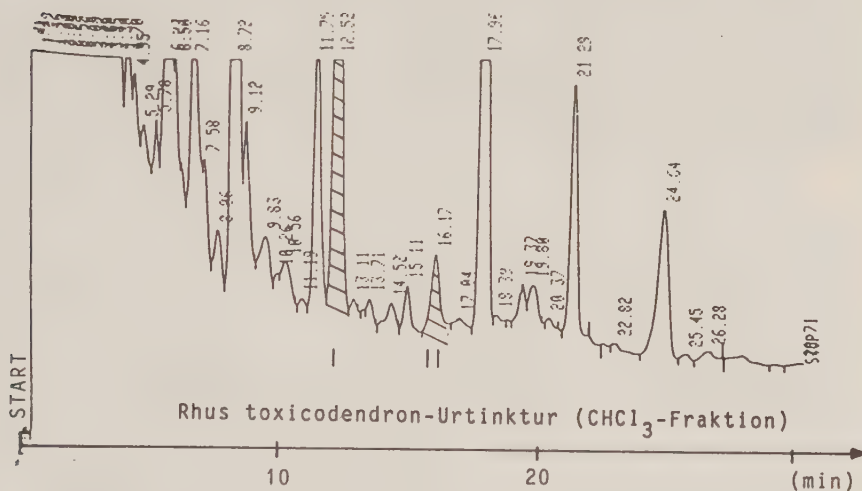
Für die anschließende Untersuchung des lipophileren Bereiches wurde zunächst ein von ELSOLY und Mitarb. (159) vorgeschlagenes Laufmittel (85% MeOH isokratisch) leicht modifiziert: Durch Verwendung von 80 % Acetonitril anstelle von Methanol mit einem Zusatz von 1 %iger 0,1 N H_3PO_4 konnte die Auflösung und Form der Peaks des Urushiol-Referenzgemisches verbessert werden.

Für die Untersuchung der CHCl_3 -Fraktion entwickelten wir ein

Gradientensystem (HPLC-T2), da bei isokratischer Arbeitsweise keine optimale Trennung des komplexen Gemisches zu erhalten war. Das Urushiol-Referenzgemisch konnte mit dieser Methode in 3 Hauptpeaks und 6 weitere Peaks aufgetrennt werden.



Urushiol-Referenzgemisch (M.A.ElSohly)



Rhus toxicodendron-Urtinktur (CHCl₃-Fraktion)

Abb.45: HPLC-Trennungen im TS HPLC-T2

I = b: Urushiol 15:2 (n-4)

II= c: Urushiol 15:1 (n-7)

Nach der von ELSOHLY und Mitarb. (159) beschriebenen Elutionsreihenfolge sollte es sich bei den 4 Hauptpeaks um "saturologe"*) Urushiole (15:3) [a], (15:2) [b], (15:1) [c] und 15:0 [d] handeln. Eine Zuordnung von [d] zu synthetischem 3n-Pentadecylcatechol konnte durch Cochromatographie erreicht werden. Um die anderen Peaks zuzuordnen, detektierten wir bei zwei Wellenlängen (254 u. 280 nm) und verglichen, wie vorgeschlagen, die Quotienten der beiden Flächenwerte. Dieses Verfahren war allerdings nicht reproduzierbar.

Da die molaren Extinktionen der Verbindung (vgl. Abb. 46) bei beiden Wellenlängen sehr gering sind, ergibt die Bildung des Quotienten nur sehr ungenaue Werte. Außerdem ist die Wahl der Wellenlängen theoretisch nicht begründbar.

Viel sinnvoller erschien es uns, das 192:280 nm-UV-Signalverhältnis zu bilden: Während alle saturologen Urushiolverbindungen aufgrund der langwelligen Phenolbande bei 280 nm gleich stark absorbieren, unterscheiden sie sich bei 192 nm infolge der unterschiedliche Zahl der Doppelbindungen. Da die Doppelbindungen isoliert vorliegen, verhalten sie sich bezüglich der molaren Extinktion additiv. Folglich müssen sich bei Quotientenbildung mit abnehmender Zahl der Doppelbindungen absteigende Werte ergeben.

*) zur Nomenklatur: [nach (162,163)]

In Anlehnung an die IUPAC-Nomenklatur für ungesättigte Fettsäuren wird für n-Alkylphenole eine Kurznomenklatur verwendet: Name, Kettenlänge n, Anzahl der Doppelbindungen und, in Klammern gesetzt, die Position n-x der ersten Doppelbindung vom Kettenende aus betrachtet.

Unterscheidet man sich solche Verbindungen nur durch die Lage der Doppelbindung im Molekül, wobei bereits vorhandene Doppelbindungen bezüglich ihrer Lage und Konfiguration unberührt bleiben, so können sie als "saturologe" Verbindungen bezeichnet werden.

Date: 03/02/1987
 Spectrum (nm): 10.9080
 Reference (nm): 10.9962
 Attn (mAU): 146.1
 Absorbance (mAU) (nm): 125.2 (199/2)

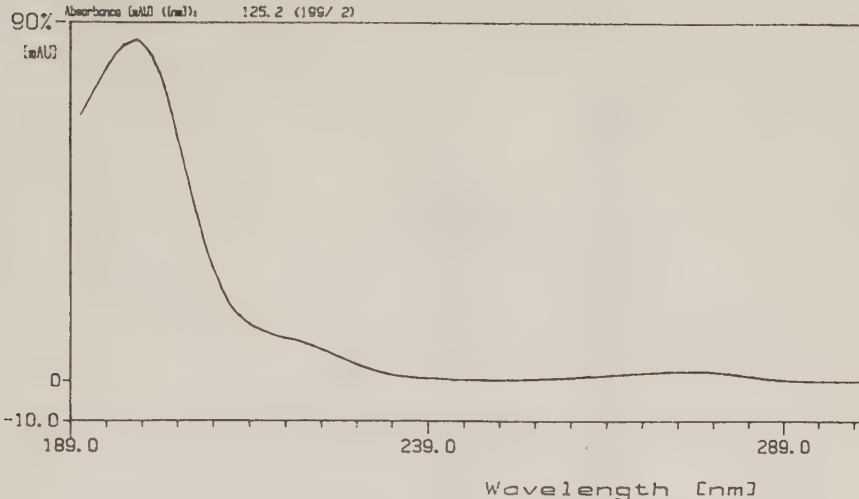


Abb. 46: UV-Spektrum von Urushiol 15:3 (n-1)

Abb. 47 zeigt die ermittelten Quotienten aus verschiedenen HPLC-Läufen. Aus einem Urushiol-HPLC-Peak kann so die Zahl der Doppelbindungen ermittelt werden. Wir haben dazu simultan bei beiden Wellenlängen detektiert und über die Peakhöhenmethode das Signalverhältnis für die jeweiligen Peaks gebildet. Aufgrund der erhaltenen Quotienten kann man den "Saturologen" nach Abb. 47 die Zahl der enthaltenen, nicht konjugierten Doppelbindungen zuordnen. Die Retentionszeit kann Hinweise darauf geben, ob eine C₁₅- oder C₁₇-Verbindung vorliegt.

Für die Chloroformfraktion des Toxicodendron-Extraktes konnten wir 2 Peaks mit einem für Urushiole charakteristischen UV-Spektrum finden.

Die errechnete Quotientenzahl für Peak I war 30,9. Daraus, und aus der Retentionszeit schlossen wir auf das Vorliegen von 15:2-Urushiol als Hauptverbindung. Peak II war zu klein für eine solche Auswertung, konnte aber aufgrund der Retentionszeit dem 15:1-Urushiol zugeordnet werden.

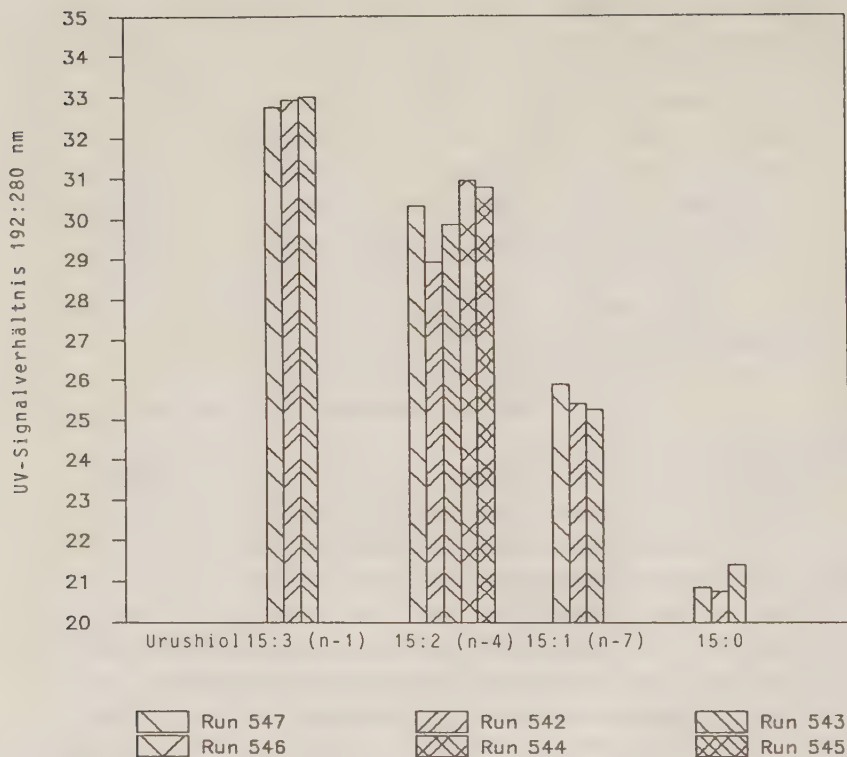


Abb. 47: UV-Signalverhältnis verschiedener Urushirole

Zur Bestätigung führten wir gaschromatographisch-massenspektroskopische (GC/MS)-Untersuchungen durch. Hierzu war eine Derivatisierung der Urushirole erforderlich. Wir silylierten mit Bis-(trimethylsilyl-)trifluoracetamid (BSTFA) unter Zusatz katalytischer Mengen an TMCS.

Die Verwendung einer OV-225-Kapillarsäule ergab für die persilylierten Urushirole eine bessere Auftrennung als die Verwendung einer CP Sil 19-CB-Säule. Allerdings beeinträchtigt das niedrige Temperaturlimit von 210 °C die Qualität der Trennung.

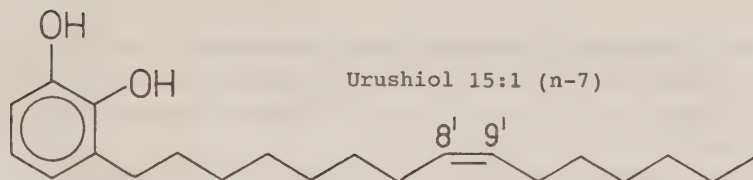
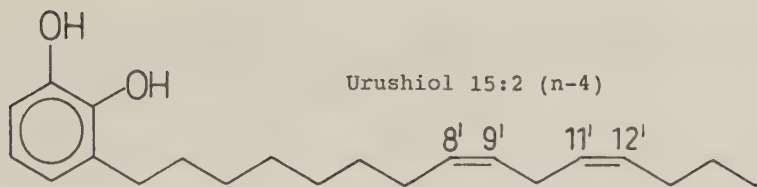


Abb. 48: Urushiole in der Chloroformfraktion

Diese Untersuchungen bestätigten die HPLC-Peakzuordnung: Im Referenzgemisch überwog 15:1-Urushiol bei weitem, während 15:2-Urushiol den geringsten Anteil am Gemisch hatte.

Bei GC/MS-Untersuchung der Chloroformfraktion (auf CP Sil 19-CB) erhielten wir einen nicht vollständig aufgelösten Peak mit folgenden für Urushiole charakteristischen Massenfragmenten:

Tab. 19: GC/MS der persilylierten Urushiole:

m/z	(rel Int. %)*)	Zuordnung
462	(18)	M ⁺ von Urushiol 15:1
460	(43)	M ⁺ von Urushiol 15:2
447	(3)	M ⁺ -15 von Urushiol 15:1
445	(2)	M ⁺ -15 von Urushiol 15:2
267	(10)	Tropyliumion mit 2 OTMS-Gruppen <u>1</u>
179	(39)	<u>2</u>

*)bezogen auf m/z 73 = (CH₃)₃Si⁺

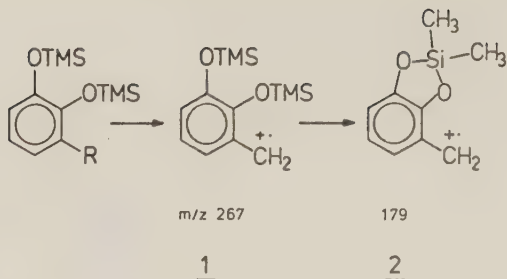


Abb. 49: Fragmentierungsschema von PTMS-Urushiol [nach(151)]

Die Zuordnung der Fragmente steht in Übereinstimmung mit den Literaturdaten (151,152,153).

Damit war bestätigt, daß in der homöopathischen Urtinktur "Rhus toxicodendron" ein Gemisch von 15:1- und 15:2-Urushiol vorlag.

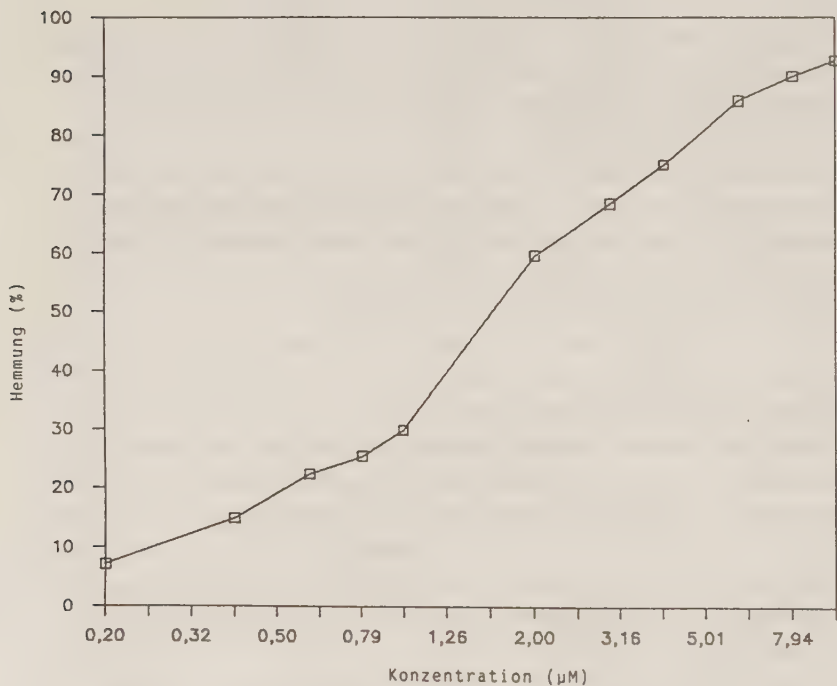


Abb.50: Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Urushiol

7.2.2.3 Pharmakologische Untersuchung der Hauptinhaltsstoffe

Urushiol:

Für das Urushiol-Referenzgemisch fanden wir im Prostaglandin-synthesetest eine starke dosisabhängige Hemmwirkung mit einem IC_{50} von 1,6 μM (Abb. 50).

Bei Inkubation von menschlichen Thrombozyten (Kap. 2.4.1) mit 5 μM Urushiol erhielten wir folgendes Chromatogramm der Arachidonsäuremetaboliten:

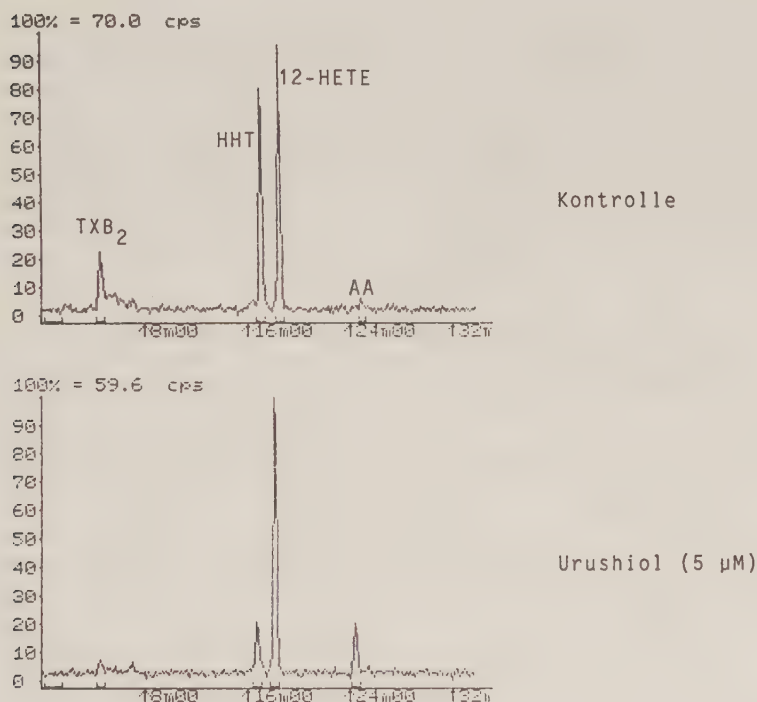


Abb. 51: Einfluß von Urushiol auf die Arachidonsäuremetaboliten in Humanthrombozyten

Die Cyclooxygenaseprodukte HHT und Thromboxan B2 waren um 66,3 % bzw. 70,1 % vermindert, während das 12-Lipoxygenaseprodukt 12-HETE um 63,7 % zunahm. Auch der Anteil an nicht umgesetzter Arachidonsäure war deutlich erhöht.

Im 5-Lipoxygenasetest (55) fanden wir ebenfalls eine starke Hemmwirkung mit einem IC_{50} -Wert von 2 μ M.

Eine Verbindung, die in der Lage ist, sowohl den Cyclooxygenase- als auch den 5-Lipoxygenaseweg zu blockieren, könnte für therapeutische Zwecke gegenüber einem reinen Cyclooxygenasehemmer erhebliche Vorzüge aufweisen (53,54).

Gallussäureethylester:

Der Gallussäureethylester stimulierte die Cyclooxygenaseaktivität im Konzentrationsbereich unterhalb 600 μ M. Erst oberhalb dieser Konzentration konnten wir inhibierende Eigenschaften beobachten. Möglicherweise spielen im hohen Konzentrationsbereich die antioxidativen Eigenschaften einer Substanz eine Rolle.

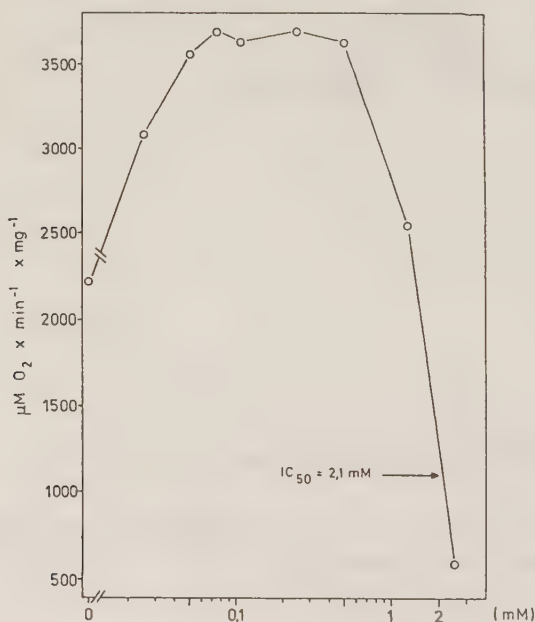


Abb. 52: Gallussäureethylester im Cyclooxygenasetest

7.2.2.4 Urushiol-Gehaltsbestimmung und Standardisierungsversuche für den Extrakt

Bei der HPLC-Gehaltsbestimmung fanden wir in der Chloroformfraktion einen Gehalt von 1,4 µg (15:2)-Urushiol und 0,18 µg (15:1)-Urushiol entsprechend 1.03 % Gesamturushiol.

Rein rechnerisch hätte sich daher nur ca. 1/3 der Hemmwirkung der Chloroformfraktion auf das Vorhandensein des Urushiols zurückführen lassen. Diese Diskrepanz veranlaßte uns, der Frage der Stabilität des Urushiols nachzugehen, denn zwischen Testung und Gehaltsbestimmung hatte ein Zeitraum von 2 Monaten gelegen. Während unserer Arbeiten mit der Urtinktur war eine Abnahme der Urushiolkonzentration in der wässrig-ethanolischen Lösung zu beobachten. Nach 5-monatiger Lagerung war mittels HPLC kein Urushiol mehr nachweisbar. In der Literatur ist die extreme Neigung der Substanz zur Oxidation und Polymerisation beschrieben worden (145,159). Möglicherweise kommt es auch in der Urtinktur zur Bildung der von BALINT et al.(161) beschriebenen Dimerisierungsprodukte. Hierzu könnte auch der saure pH-Wert der Lösung (pH 4,5) beitragen.

In vier weiteren Urtinkturen des Handels konnte kein Urushiol mehr nachgewiesen werden. Es kann daher vermutet werden, daß der Herstellungszeitpunkt entscheidenden Einfluß auf die meßbare Konzentration an Urushiol hat.

Tatsächlich bewirkte eine nunmehr Urushiol-freie Chloroformfraktion nur noch eine geringfügige (12,3 %ige) Hemmung der Prostaglandinbiosynthese.

In einem weiteren Versuch stellten wir daher aus frischen Blättern von *Toxicodendron radicans* eine ethanolische Tinktur mit hohem Urushiolgehalt her.

Abb.53 zeigt den HPLC-Fingerprint dieser Tinktur.

Die Zuordnung der "saturologen" Urushiole erfolgte auch hier nach der von uns entwickelten UV-192/280 nm-Signalverhältnis-Methode und durch die Retentionszeiten.

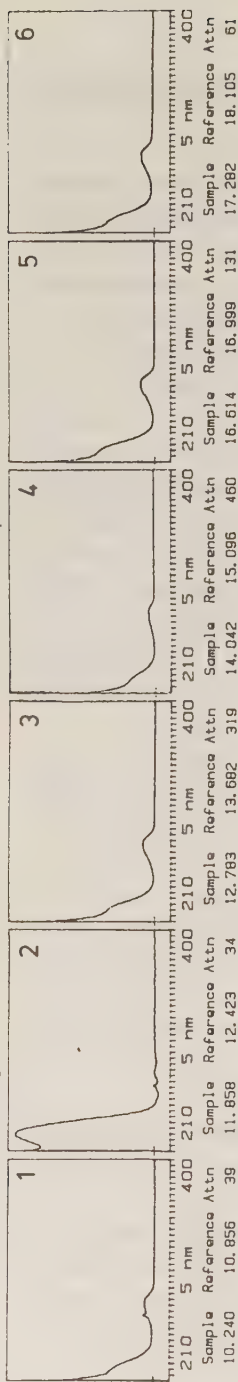
Eine daraus erhaltene Chloroformfraktion ergab eine vollständige Hemmung der Prostaglandinsynthese. Diese Untersuchungen sprechen dafür, daß das Urushiol ganz oder zum Großteil für die Hemmwirkung der Chloroformfraktion verantwortlich

File: RHUS 2

Date: 05/16/1987

Rhus radicans-96%MeOH
origin

Bot. Garten Dr. Heubl
sample id.



analysis 21 mg/ml EtOH
inj. vol. 15 µl
mobile ph. A: Wasser +H3PO4
" " B: MeCN +H3PO4
" " 70%B -95%B in 20 min
" " 1.0 ml/min
stat. ph. LiChrospher RP18; 5µm
column Hibar 125-4 (Merck)
run no. 311 Det.: 210 nm
remarks 8 Tage mazeriert
" Frischdage v. 7.5.87

Zuordnung

- 1 = Urushiol 15:3
- 3 = Urushiol 15:2
- 4 = Urushiol 17:2
- 5 = Urushiol 15:1

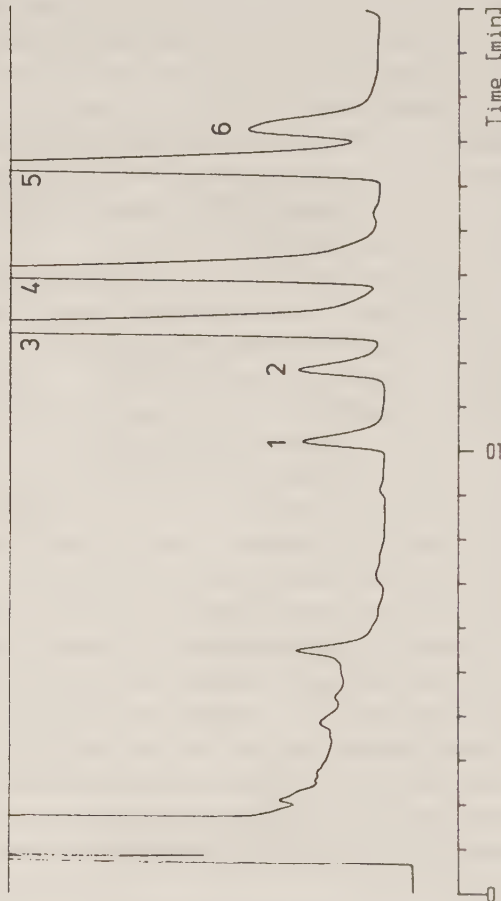


Abb. 53: HPLC-Fingerprintanalyse einer ethanolischen Toxicodendron-Tinktur

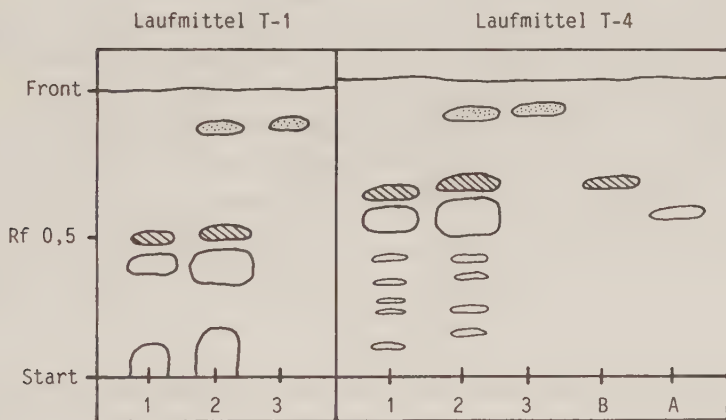
sein dürfte.

Für eine Standardisierung solcher Urtinkturen bietet sich das von uns angegebene HPLC-Verfahren an. Eine Standardisierung von Extrakten und Tinkturen auf die Urushiole erscheint wegen der teils positiven, teils negativen biologischen Aktivitäten dieser Substanzen sinnvoll.

7.2.3 Untersuchungen der EtOAc- und der n-BuOH-Fraktion

7.2.3.1 Identifizierung der Flavonolglykoside

Wir chromatographierten EtOAc- und n-BuOH-Fraktion zunächst im Laufmittel DC -T1.



Färbung nach Det-3 im UV 366 nm

violett

gelb

orange

1: n-BuOH-Fraktion

2: EtOAc- Fraktion

3: Gallussäureethylester

A: Myricitrin

B: Quercitrin

Abb. 54: DC der EtOAc- und der n-BuOH-Fraktion

Bei Detektion mit FeCl_3 -Lösung [Det-4] wies die Ethylacetatfraktion bei R_f 0,9 eine blau anfärbbare Zone (C) auf, die wir dem Gallussäureethylester zuordnen konnten. Bei R_f 0,5 und 0,45 enthielten beide Fraktionen zwei grau anfärbbare Zonen B und C. Im R_f -Bereich $\leq 0,1$ war in beiden Fraktionen ein blau anfärbbarer Bereich sichtbar. Nach dem Färbeverhalten sollte es sich um weitere Gallussäurederivate handeln. Die erneute Entwicklung einer DC-Platte im gleichen Laufmittel mit anschließender Naturstoff-PEG-Detektion [Det-3] ergab eine intensiv gelb gefärbte Zone B und eine intensiv orange gefärbte Zone A, die im UV-365 noch verstärkt wurde. Daher sollte es sich bei diesen beiden Verbindungen um Flavonoide handeln. Bei der Chromatographie mit Referenzsubstanzen im Laufmittel T-4 verhielt sich Zone B wie Quercitrin und Zone A wie Myricitrin.

Nach Mikrohydrolyse mit HCl -Dampf auf der DC-Platte und Entwicklung in eine 2. Richtung konnten als Aglyka Quercetin bzw. Myricetin (Laufmittel T-5) und für beide Verbindungen Rhamnose nachgewiesen werden (Laufmittel T-6). Durch präparative DC ließen sich beide Substanzen in geringer Menge isolieren. Nach HPLC-Retentionszeit und UV-Spektren waren damit die beiden Flavonolglykoside als Myricitrin und Quercitrin identifiziert.

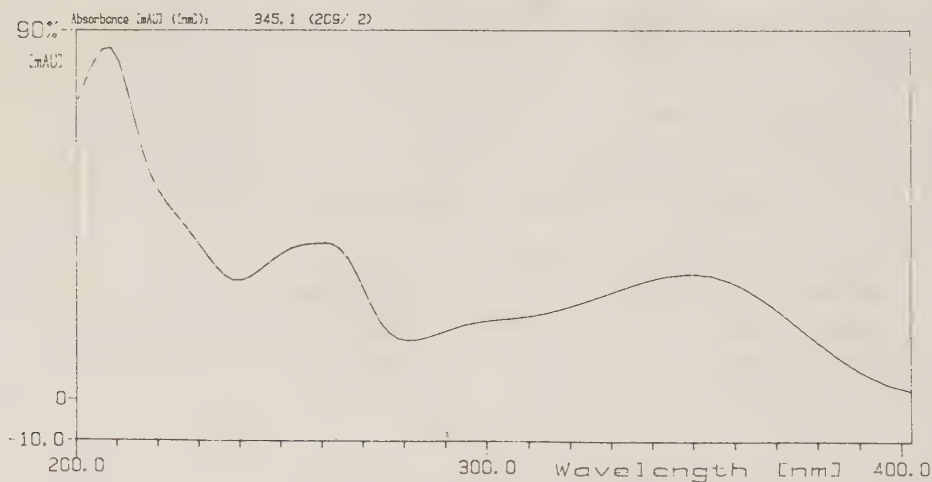


Abb. 55: UV-Spektrum von Myricitrin

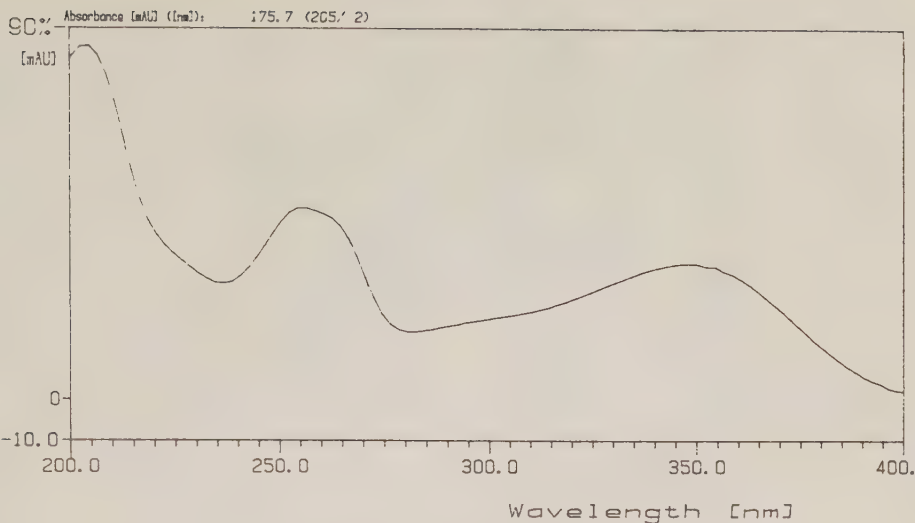


Abb. 56: UV-Spektrum von Quercitrin

7.2.3.2 Identifizierung der weiteren Gallussäureester und HPLC-Fingerprintanalyse

Die HPLC-Analyse der EtOAc- und der n-BuOH-Fraktion im Trennsystem HPLC-T1 und Detektion bei 280 nm lieferte die in Abb. 57 und 59 wiedergegebenen HPLC-Chromatogramme:

Außer den beiden Flavonolglykosiden enthielt das Chromatogramm noch mehrere Peaks, die dem UV-Verhalten nach auf Gallussäurederivate schließen ließen.

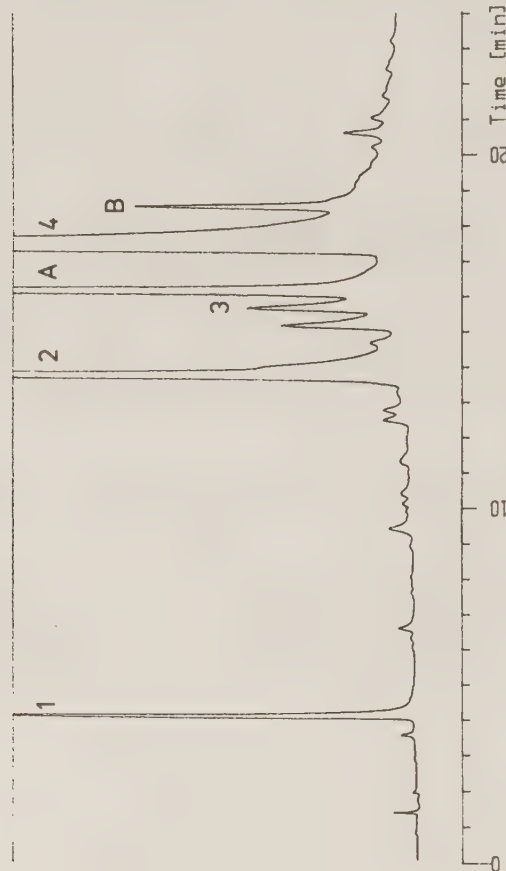
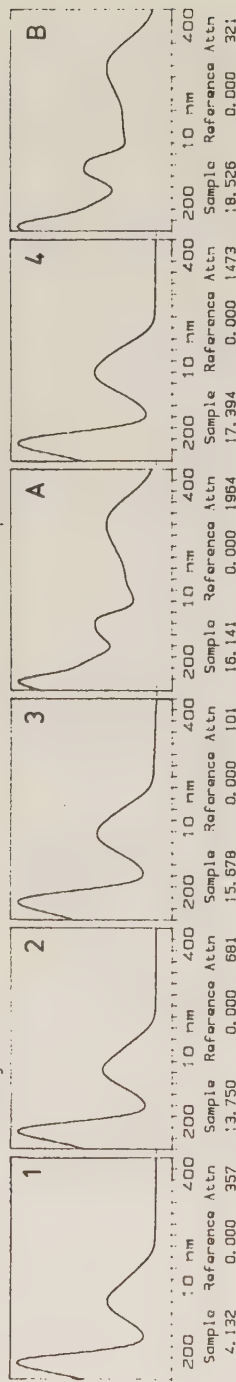
Peak 1 und Peak 2 zeigten ein praktisch identisches UV-Spektrum mit Maxima bei 217 und 273 nm. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen konnte Peak 1 als Gallussäure und der später eluierte Peak 2 als Gallussäureethylester identifiziert werden.

File: RHUS 2

Date: 05/30/1987

Rhus Tox. Untinktur
origin

Fa. DHU Ch. K140
sample id.



analysis EtOAc-Fraktion

inj. vol. 3 μ l Det.: 280 nm

mobile ph. A: Wasser+1%, 1N H3PO4

" B: MeCN +1%, 1N H3PO4

" 3 %B -40%B in 30 min

" 1.0 ml/min

stat. ph. LiChrospher RP18; 5 μ m

Zuordnung

- 1 = Gallussäure
- 2 = Gallussäureethylester
- 3 = β -1,2,3,6-Tetragalloyl-D-glucose
- 4 = β -Pentagalloyl-D-glucose
- A = Myricitrin
- B = Quercitrin

Abb. 57: HPLC-Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion

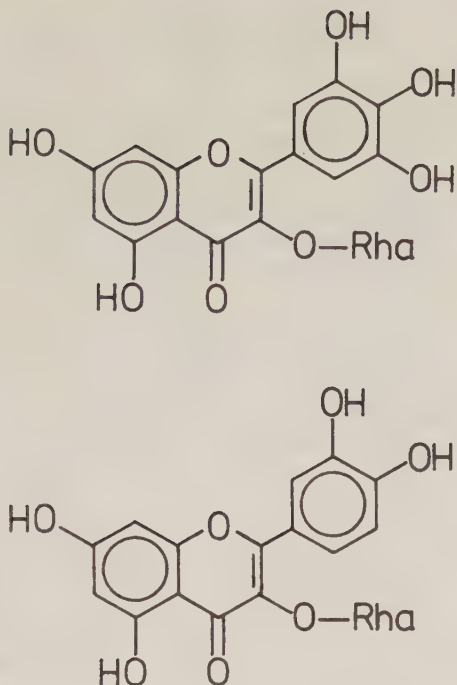


Abb. 58: Myricitrin (oben), Quercitrin (unten)

Peak 3 und 4 unterschieden sich von Peak 1 und 2 durch die Lage des 2. Maximums bei 279 nm. Durch Vergleich mit authentischer Referenzsubstanz konnte Peak 3 als β -1,2,3,6-Tetra-galloyl-D-glucose und Peak 4 als β -D-Pentagalloyl-D-glucose identifiziert werden. Durch einen Vergleich mit einem Tannin-gemisch (DAB 7) ließ sich zeigen, daß in der EtOAc-Fraktion noch weitere Verbindungen mit vermutlich höherer Zahl von Gallussäuremolekülen (Hexa- bis Nonagalloylglucose) in der EtOAc-Fraktion vorkommen.

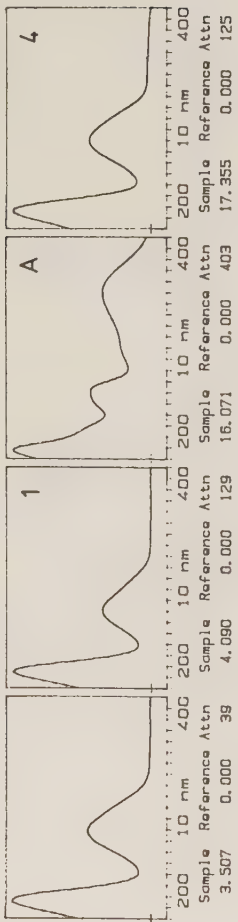
Die EtOAc-Fraktion wies einen wesentlich höheren Gehalt an Gallotanninen und Flavonoiden als die BuOH-Fraktion auf. Der Gallussäureethylester fehlte in der BuOH-Fraktion völlig. Da die einzelnen Gallotannine im Prostaglandinsynthesetest unter-

File: RHUS 1

Date: 05/30/1987

Rhus tox. Urntinktur
origin

Fa. DHU Ch. K140
sample id.



analysis n-BuOH-Fraktion

inj. vol. 3 µl

mobile ph. A: Wasser+1%O, 1N H3PO4

" B: MeCN +1%O, 1N H3PO4

" 3 %B -40%B in 30 min

" 1.0 ml/min

stat. ph. LiChrospher RP18; 5µm

Zuordnung

1 = Gallussäure

A = Myricitrin

4 = β-Pentagalloyl-D-glucose

Det.: 280 nm

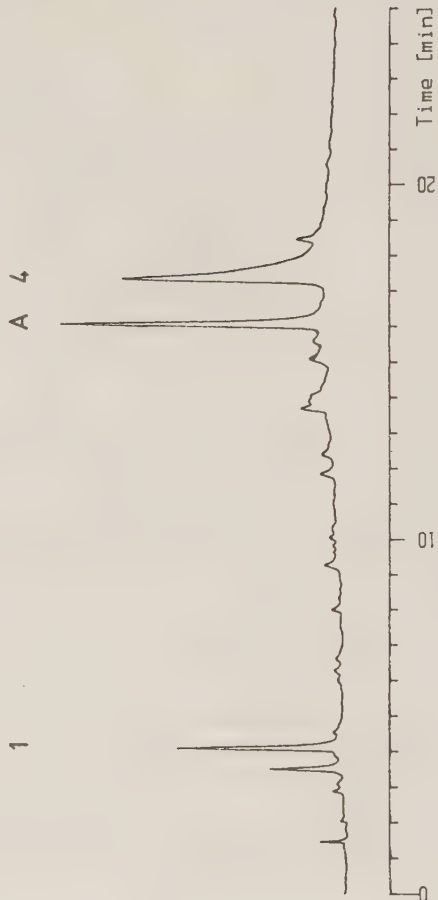
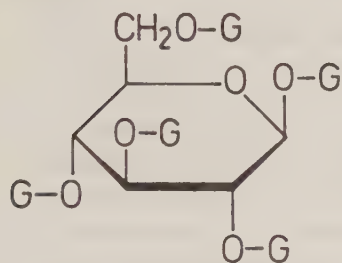


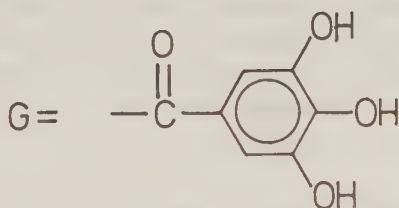
Abb. 59: HPLC-Fingerprinanalyse der n-BuOH-Fraktion

schiedliche starke Wirkungen (siehe Kap. 7.3) aufwiesen, wäre zur Korrelation von Gehalt und Wirkung eine Einzelbestimmung der Gallotannine erforderlich gewesen. Da uns diese nicht in ausreichender Menge als Standards zur Verfügung standen, konnte keine Gehaltsbestimmung durchgeführt werden. Dennoch läßt sich schon aus dem Vergleich der Chromatogramme erkennen, daß vermutlich der wesentlich höhere Gehalt an Gallotanninen in der Ethylacetatfraktion für die Hemmwirkung dieser Fraktion verantwortlich sein dürfte.

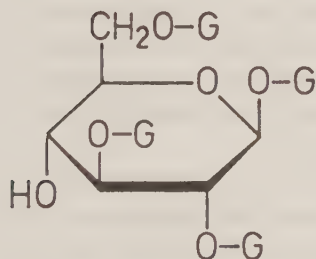
Die Flavonolglykoside wurden schon von MICHEL et al. (19) im Cyclooxygenasetest untersucht: Sie zeigten bei 100 µM keine Enzymhemmung und dürften demnach auch keinen Beitrag zu der für diese Fraktionen gemessenen Hemmwirkung leisten.



β -Pentagalloyl-D-glucose

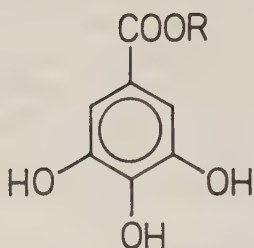


Galloylrest



β -1,2,3,6-Tetragalloyl-D-glucose

Abb. 60: Gallotannine der EtOAc- und n-BuOH-Fraktion



R = H: Gallussäure

R = C₂H₅: Gallussäureethylester

Abb. 61: Identifizierte Gallussäureverbindungen

7.2.4 Screeninguntersuchung von Gerbstoffen im Prostaglandinsynthesetest

In der Literatur sind für einige niedermolekulare Tannine Hemmwirkungen auf arachidonsäuremetabolisierende Enzyme beschrieben worden (33). Wir haben daher die in den Toxicodendron-Extrakten vorkommenden Gallotannine und zusätzlich weitere niedermolekulare Tannine sowie Tanninvorstufen, die uns aus Isolierungs- und Synthesearbeiten zur Verfügung standen (Herkunft siehe Exp. Teil) im Prostaglandinsynthesetest untersucht (Tab. 20).

Während SANKAWA und Mitarb. (31) für bestimmte Depside mit Alkylseitenketten aus Lichen-Arten (siehe Kap.1.4) starke Hemmwirkungen auf die Cyclooxygenase fand, waren die von uns untersuchten einfachen Depside m-Di- und m-Trigallussäure praktisch unwirksam.

Bei den Gallotanninen zeigte sich eine mit steigender Gallussäurezahl zunehmende Hemmwirkung. Ein von uns im Cyclooxygenaseassay untersuchtes Tanningemisch (DAB 7) zeigte eine dosisabhängige Enzymhemmung. Der IC₅₀-Wert lag bei 10 µM (Abb. 62).

Tab. 20:

Substanz (25 µM)	Strukturtyp	Hemmung der PGS (%)*)
m-Digallussäure	Depsid	7,9
m-Trigallussäure	"	5,4
Trigalloylglucose	Gallotannin	6,1
Tetragalloylglucose	"	34,7
Pentagalloylglucose	"	47,5
Hamamelitannin	Galloylhamamelose	7,7
Ellagsäure		8,2
Chebulinsäure	Ellagengerbstoff	12,0
Chebulagsäure	"	+ 7,6
Geraniin	"	10,4
Pedunculagin	"	+13,8
(-)-Catechin	Flavan-3-ol	61,7
(+)-Catechin	"	57,3
(-)-Fisetinidol	"	+13,0
(-)-Robinetindol	"	+ 2,2
(+)-Mesquitol	"	6,8
(-)-Teracacidin	Flavan-3,4-diol	13,0
(+)-Mollisacacidin	"	22,3
(+)-Leucofisetinidin	"	14,8
(-)-Leucofisetinidin	"	22,3
[4,8]-3,4-trans-(-)Fisetinidol-(+)-catechin		21,9
[4,8]-3,4-cis-	" - "	20,6
[4,6]-3,4-cis-	" - "	26,3
Phlobatannin		12,4

+) = Stimulierung

*) Mittelwerte aus mind. 2 Messungen

Da dieses Gemisch noch weitere, auch höhere Galloylglucosen enthält, muß angenommen werden, daß der Hemmeffekt für Verbindungen mit mehr als 5 Gallussäureresten noch weiter stark zunimmt. Hingegen scheinen die Ellagengerbstoffe die Cyclooxygenase weniger stark zu beeinflussen.

Das Catechin mit seiner bekannten Hemmwirkung stellt offenbar

einen Ausnahmefall dar, denn die von Flavan-3-ol und Flavan-3,4-diol abgeleiteten Dimerverbindungen zeigten ebenso wie die monomeren Ausgangsverbindungen nur eine mäßige Hemmung der Prostaglandinsynthase.

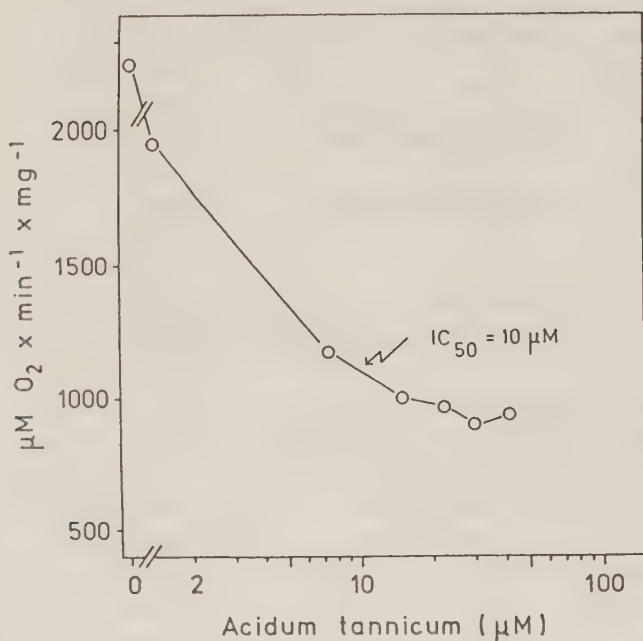


Abb. 62: Einfluß von Acidum tannicum (DAB7) auf die Cyclooxygenaseaktivität

Die Art des Hemmechanismus der Gallotannine konnte in unserem Testsystem nicht untersucht werden. Es wäre allerdings von Interesse, zu prüfen, inwieweit es sich um antioxidative, proteindenaturisierende oder durch Bindung an Enzymprotein ausgelöste Hemmungen handelt, denn auch bei anderen Enzymsystemen wurden in Abhängigkeit von der Zahl der Gallussäuremoleküle Hemmwirkungen beobachtet (160).

Weiter wäre zu klären, ob mit Verbindungen dieser Stoffklasse

überhaupt therapeutische Effekte erzielt werden können. Möglicherweise ist eine Resorption der Gerbstoffe aufgrund von Nebenwirkungen sogar unerwünscht.

Unabhängig davon ist die in-vitro-Wirkung der Gallotannine auch für das Screening von Pflanzenextrakten von Bedeutung, da sehr viele Pflanzenextrakte Gallotannine enthalten. Das heißt, daß diese vor einer Testung abgetrennt werden müssen, damit nicht die Suche nach anderen potentiellen Hemmstoffen durch hohe Tannininhibitionseffekte gestört wird.

7.2.5 Diskussion der in Kapitel 7 erhaltenen Ergebnisse

Die durch eine homöopathische Urtinktur bewirkte starke Hemmung der Prostaglandinsynthese kommt nach unseren Untersuchungen etwa zur Hälfte dem in der Urtinktur vorhandenen Urushiol (in der Chloroformfraktion) und zur Hälfte den Gallotanninen vom Typ der β -Pentagalloyl-D-glucose zu, die sich bevorzugt in der EtoAc-Fraktion angereichert finden. Für rein ethanolische Extrakte, die diese Inhaltsstoffe ebenfalls enthalten, dürfte eine ähnlich starke in-vitro-Hemmwirkung erwartet werden.

Inwieweit mit Toxicodendron-Extrakten oder Urtinkturen in-vivo Wirkungen erzielt werden können, sollte Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen sein. Die hierzu zu verwendenden Extrakte müssen nach den beschriebenen HPLC-Methoden standardisiert sein.

Bei unseren Untersuchungen erwies sich ein Urushiolgemisch aus Toxicodendron radicans als starker "dualer" Hemmstoff von Prostaglandinsynthese und 5-Lipoxygenase.

Da diese Verbindungen aufgrund ihres allergenen Potentials in reiner Form für die Therapie nicht in Frage kommen, sollten strukturell ähnliche Verbindungen mit geringerer Allergisierungsgefahr im Prostaglandinsynthesetest geprüft werden. Ausgangspunkt solcher Untersuchungen könnten dafür die n-Alkylphenole Cardanol und Cardol sein, die von SCHWENKER u. Mitarb. (162,163) aus Schinus terebinthifolius RADDI und Anacardium occidentale isoliert wurden.

8 Diskussion der Ergebnisse

8.1 Der Prostaglandinsynthesetest als Screeningmethode

Der Prostaglandinsynthesetest eignete sich gut für Screeninguntersuchungen mit etherischen Ölen und Reinsubstanzen. Nach unseren Erfahrungen müssen vor einem Screening von Extrakten Begleitstoffe wie Gallotannine und Chlorophyllabbauprodukte abgetrennt werden.

Für den Test ist die Verwendung [$1-^{14}\text{C}$]-markierter Arachidonsäure und anschließende radiochromatographische Auswertung unbedingt erforderlich, da die UV-Detektion der Prostaglandine wenig empfindlich ist und durch stark absorbierende Naturstoffe gestört wird. Die von uns zur Auswertung entwickelte HPLC-Methode verbesserte die Trennschärfe der Metaboliten gegenüber der üblichen DC-Methode und erhöhte die Genauigkeit der Methode.

Der Prostaglandinsynthesetest vermag tierexperimentelle Untersuchungen als Screeningmethode weitgehend zu ersetzen, da eine gute Korrelation zum Rattenpfotenödemtest besteht.

Zur weiteren Charakterisierung aufgefundener Inhibitoren sind allerdings Untersuchungen mit intakten Zellsystemen (Thrombozyten, PMNL) durchzuführen.

Erst wenn die in-vitro-Voruntersuchungen positiv ausgefallen sind, sollte eine in-vivo-Testung durchgeführt werden.

8.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Unsere Untersuchungen bestätigen und ergänzen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (15,18,26) auf diesem Gebiet: nahezu alle im Rahmen unserer Untersuchungen gefundenen Inhibitoren besitzen eine phenolische Gruppe. Wird diese maskiert, kommt es in der Regel zu einer deutlichen Wirkungsschwächung. Eine Catecholstruktur scheint hingegen für eine Inhibition nicht essentiell zu sein, da Urushiol hemmend, Esculetin hingegen stimulierend auf die PGS wirkt. Sehr großen Einfluß auf die Inhibitoreigenschaften einer

Substanz hat das Vorhandensein von lipophilen Substituenten, die vermutlich eine Konkurrenz mit der Arachidonsäure um Substratbindungsstellen des Enzymkomplexes ermöglichen. Beim E/Z-Ajoen wird die lipophile Kette durch eine Sulfoxidgruppierung ergänzt, die möglicherweise die Funktion der phenolischen Gruppe übernimmt.

Glykosidische Verbindungen, die in pflanzlichen Extrakten in zumeist großer Menge vorkommen, zeigen aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften keinerlei Hemmwirkungen auf die Prostaglandinbiosynthese.

8.3 Zum Mechanismus der Hemmungen

Eigene Untersuchungen zur Hemmkinetik wurden nicht durchgeführt. Da die einfachen phenolischen Verbindungen wie Carvacrol in vielen Eigenschaften dem von DEWHIRST (27) untersuchten Eugenol ähneln, ist anzunehmen, daß hier ebenfalls ein kompetitiver, reversibler Hemmechanismus vorliegt.

Da phenolische Verbindungen häufig antioxidative Eigenschaften besitzen, mußte geklärt werden, inwieweit ein Zusammenhang zur Hemmung der Prostaglandinsynthese besteht.

Eine Möglichkeit, Radikalfängereigenschaften einer Substanz zu erfassen, bietet folgender Versuchsansatz: Man erzeugt mit einem azellulären System nach CHESON et al. (165) [Purin und Xanthinoxidase] Superoxidradikalanionen, die mit zugesetztem Luminol reagieren und eine Chemilumineszenz verursachen.

Ein typischer Radikalfänger wie Gallussäureethylester ist in der Lage, die entstehenden Superoxidradikalanionen abzufangen (166) und somit die Chemilumineszenz zu unterdrücken. Die innerhalb von 20 min gemessene Chemilumineszenz wurde mit der einer Kontrollinkubation ohne Testsubstanz verglichen (Tab. 21):

Chemilumineszenz in % der Kontrollinkubation			
Konzentration	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4} (mg/ml)
Carvacrol	60,3	122,4	156,1
Eugenol	25,5	85,9	121,9
Urushiol	42,6	111,8	124,5
Curcumin	80,1	106,6	106,0
Acidum tannicum	5,1	30,4	143,9
Gallussäure- ethylester	0,1	1,0	22,4

(Tab.21)

Carvacrol, Urushiol und Curcumin zeigen in der Konzentration von 10^{-3} mg/ml keine Hemmung der Chemilumineszenz. Das heißt, daß diese Substanzen in einer Konzentration, in der sie Prostaglandinsynthese zu mindestens 50 % hemmen, keine Radikalfängereigenschaften gegenüber $\cdot\text{O}_2^-$ entwickeln. Der Radikalfänger Gallussäureethylester hingegen bewirkt in der gleichen Konzentration noch eine 99 %ige Reduktion der Chemilumineszenz. Auch das Tanningemisch (DAB 7) weist solche Eigenschaften auf.

Diese Experimente bestätigen die von BAUMANN et al. (17) bei der Untersuchung von Flavonoiden und Naphtholen gemachte Aussage, wonach kein kausaler Zusammenhang zwischen den $\cdot\text{O}_2^-$ - Radikalfängereigenschaften einer Substanz und der von ihr bewirkten Inhibition der Prostaglandinsynthese besteht.

8.4 Ausblick für die Therapieanwendung

Grundsätzlich ist es nicht zulässig, aus in-vitro-Experimenten Aussagen über eine antiinflammatorische Aktivität in vivo abzuleiten. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen über Resorption, Bioverfügbarkeit, Metabolisierung und Toxizität erforderlich.

Da bereits verschiedene Arbeitskreise solche Untersuchungen mit Eugenol durchgeführt haben, sind aber gewisse Rückschlüsse auf das Verhalten anderer einfacher Phenole wie Carvacrol (deren in-vitro Verhalten dem des Eugenols ähnelt), erlaubt. DEWHIRST (27) fand bei topischer Applikation einer ethanolischen Eugenollösung eine 65 %ige Hemmung des Carragenan-induzierten Rattenpfotenödems. Irritierende Effekte traten erst bei weit höheren Dosen auf.

LAEKEMAN et al. (85) fanden nach oraler Applikation von Eugenol und Acetoeugenol (je 100 mg/kg) bei Kaninchen eine 92 %ige bzw. 77 %ige Hemmung der Thromboxanbildung im Plasma. Allerdings wurden beide Substanzen schnell metabolisiert: die biologische Halbwertszeit lag bei 72 bzw. 40 min.

Bezüglich der Toxizität wurde Eugenol von der amerikanischen FDA als "safe" (167) eingestuft.

Somit ergibt sich insgesamt eine günstige Beurteilung solcher Substanzen zumindest für die lokale Anwendung.

Wenn man davon ausgeht, daß durch die hohe Lipophilie dieser Substanzen, die bei physiologischem pH in nichtionisierter Form vorliegen, eine gute Penetration durch Lipidmembranen gegeben ist, so ist gut vorstellbar, daß es bei topischer Anwendung zu einer Cyclooxygenasehemmung im entzündeten Gewebe kommen kann. Der antiinflammatorische Effekt, der durch Einreibungen von etherischen Ölen erzielt werden kann, dürfte zumindest z.T. auf diesem Mechanismus beruhen.

In einer klinischen Pilotstudie mit einer Nelkenöl-Salbe wurde erst kürzlich über positive Effekte bei rheumatischen Erkrankungen berichtet (168).

Durch chemische Derivatisierung können die Inhibitoreigenschaften der im Screening gefundenen Substanzen verbessert und unerwünschte Wirkungen wie die allergisierende Wirkung des Urushiols vermindert werden.

Zusammenfassung

I. 1. Als Ausgangspunkt für Screeninguntersuchungen wurde durch Literaturrecherchen eine Liste von Drogen erstellt, die in der traditionellen Medizin oder Homöopathie zur Behandlung Rheumatischer Erkrankungen eingesetzt werden. Außerdem wurde eine Übersicht über die Bestandteile von extern angewendeten Phytopräparaten mit derselben Indikation gegeben.

2. Für Screeninguntersuchungen wurden verschiedene Testsysteme, die den Arachidonsäuremetabolismus über den Cyclooxygenaseweg erfassen, etabliert. Als Enzymquelle dienten eine mikrosomale Fraktion aus Schafsamenblasen (Prostaglandinsynthasetest) sowie intakte menschliche Thrombozyten.

Anstelle der üblichen DC-Verfahren zur Quantifizierung der Arachidonsäuremetaboliten entwickelten wir ein HPLC-Trennsystem, durch das Reproduzierbarkeit und Genauigkeit des Tests verbessert werden konnten.

Die Methodik und Aussagekraft des Prostaglandinsynthasetests wurde einer Überprüfung unterzogen: Anhand des Inhibitors Carvacrol als Referenzsubstanz konnte gezeigt werden, daß die erhaltenen Ergebnisse (IC_{50} -Werte) deutlich von den gewählten Versuchsbedingungen (Substratkonzentration, zugesetzte Cofaktoren) beeinflusst werden. Ohne phenolischen Cofaktor (Adrenalin) im Reaktionsansatz zeigte Carvacrol einen biphasischen Effekt: In niedriger Konzentration ($< 10 \mu M$) wurde die Prostaglandinsynthase stimuliert, in Konzentrationen $> 10 \mu M$ hingegen gehemmt. Als Erklärung für diesen Sachverhalt wurde gefunden, daß Carvacrol die Untereinheiten der Prostaglandinsynthase in unterschiedlicher Weise beeinflusst: Während Carvacrol den Cyclooxygenierungsschritt hemmt, wird es durch die Peroxidase selbst cooxidiert und stimuliert dadurch die Prostaglandinbiosynthese insgesamt. Enthält der Inkubationsansatz andere oxidierbare Cofaktoren wie Adrenalin, so überwiegen die PGS-inhibierenden Eigenschaften des

Carvacrols. Unter den Bedingungen eines intakten Zellsystems (Humanthrombozyten) konnten die Cyclooxygenase-hemmenden Eigenschaften des Carvacrols bestätigt werden.

3. Das Screening erbrachte folgende Ergebnisse:

Von den untersuchten etherischen Ölen (Konzentration 7,5 µg/ml Inkubat) zeigten Nelkenöl (84,1%) und Zimtöl (51,9%) sowie Thymianöl (35,1 %) die stärkste Hemmung der Prostaglandinsynthese, was auf deren Gehalt an den phenolischen Verbindungen Eugenol und Aceteugenol bzw. Thymol und Carvacrol zurückgeführt werden konnte. Weitere stark wirksame Inhibitoren waren die phenolischen Curcuminoide aus *Curcuma longa* (IC₅₀ Curcumin: 8,8 µM) sowie Capsaicin (IC₅₀: 3,8 µM) aus *Capsicum annuum*. Von den untersuchten Salicylsäurederivaten aus *Salix*- und *Primula*-Arten zeigte der 4-Methoxysalicylsäuremethylester die stärkste Hemmwirkung. Ebenfalls als gut wirksam erwiesen sich die aus *Allium sativum* isolierten schwefelhaltigen Verbindungen E,Z-Ajoen (IC₅₀: 5,1 µM) und Diallyldisulfid.

- II. 1. Das etherische Öl der in der traditionellen Medizin und Homöopathie zur Rheumabehandlung eingesetzten Droge Ledum palustre bewirkte eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese um 46,6 %. Als verantwortlicher Inhaltsstoff wurde nach Fraktionierung und GC/MS-Analyse das Terphenol Carvacrol (IC_{50} : 4 μ M) identifiziert. Die Hemmstoffeigenschaften des Carvacrols wurden in verschiedenen Testsystemen näher charakterisiert.
2. Aus dem Methanolextrakt der Droge wurden durch Säulenchromatographie und Mitteldruckchromatographie 2 Cumarinderivate isoliert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden in ihrer Struktur aufgeklärt. Verbindung B konnte als das bisher nicht beschriebene Cumaringlucosid Fraxin identifiziert werden. Verbindung N wurde als das ebenfalls nicht bekannte 2-Hydroxymethyl-2-methyl-butandicarbonsäure-Acylderivat von Esculin aufgeklärt. Durch Hochfeld- 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnte die Acylierungsposition (C-6') festgelegt werden. Daneben wurde chromatographisch das Cumaringlucosid Esculin nachgewiesen.
3. Die Cumaringlucoside Esculin und Fraxin waren ohne Einfluß auf die Prostaglandinsynthese. Ihre Aglyka, die Dihydroxycumarine Esculetin und Fraxetin, bewirkten dagegen eine starke Stimulierung der Prostaglandinbiosynthese. Eine Erklärung hierfür bietet die starke Cooxidierbarkeit durch die Prostaglandinsynthese, die für Esculetin nachgewiesen werden konnte. Weiterhin erwiesen sich Esculetin und Fraxetin als potente Inhibitoren der 5-Lipoxygenase von intakten Leukozyten, die aus Schweineblut gewonnen wurden.

III.1. Bei der Untersuchung verschiedener homöopathischer Zubereitungen "Rhus toxicodendron" (aus *Toxicodendron radicans* L.) konnten wir mit abnehmender Stärke bis zu Dilutionen D₂ eine Hemmung der Prostaglandinsynthese nachweisen. Die Fraktionierung der Urtinktur ergab, daß die Wirkung etwa zur Hälfte der Chloroformfraktion und zur Hälfte in den Ethylacetat- und n-Butanol-Fractionen lokalisiert war. Als Wirkprinzip der Chloroformfraktion wurde ein n-Alkenylcatecholgemisch identifiziert. Durch Entwicklung einer HPLC-Methode, die das UV-Signalverhältnis (192 nm: 280 nm) berücksichtigt, konnten anhand eines Referenzgemisches Urushiol 15:2 (n-4) und Urushiol 15:1 (n-7) als Bestandteil dieser Fraktion nachgewiesen werden.

Urushiol erwies sich als ausgezeichneter dualer Hemmstoff sowohl der Prostaglandinsynthese (IC₅₀: 1,6 µM) als auch der 5-Lipoxygenase (IC₅₀: 2 µM).

2. Die Hemmwirkung der aus *Rhus toxicodendron*-Urtinktur hergestellten Ethylacetat- und n-Butanol-Fractionen kann auf die in beiden Fraktionen vorhandenen Gallotannine zurückgeführt werden. Durch HPLC und UV-Spektren wurden β-1,2,3,6-Tetraalloyl-D-glucose sowie β-Pentaalloyl-D-glucose identifiziert.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Hemmwirkung von Gallotanninen im Prostaglandinsynthesetest mit steigender Gallussäurezahl zunimmt.

Durch HPLC, Mikrohydrolysen und UV-Spektren konnten außerdem die nicht zur Hemmwirkung beitragenden Verbindungen Gallussäure, Gallussäureethylester sowie die bisher nicht beschriebenen Flavonolglykoside Quercitrin und Myricitrin nachgewiesen werden.

3. Die Untersuchungen verschiedener *Rhus toxicodendron*-Urtinkturen ergaben stark schwankende Urushiolgehalte, die offensichtlich auf einen Abbau des Urushiols während der Lagerung zurückzuführen sind. Zur eindeutigen Charakterisierung wurde daher von allen wirksamen Fraktionen ein HPLC-Fingerprint erstellt.

EXPERIMENTELLER TEIL

I Herkunft der Drogen, Extrakte und der Vergleichssubstanzen

1 *Ledum palustre* (Allg. Teil, Kap. 6)

1.1 Drogenmaterial:

Herba Ledi palustris, conc.

- Fa. Caesar & Loretz, Hilden:

Ch.-Nr. 10778484 und 10778175,

- Fa. Brenner, Alpirsbach

- Fa. Addipharma, Hamburg

Muster-Nr. T 96511

1.2 Vergleichssubstanzen:

- Daphnetin, Esculin, Esculetin, Scopoletin u.

Umbelliferon, Fa. Roth, Karlsruhe

- Fraxetin, Fa. Aldrich, Steinheim

- Ledol, R. Bos, Rijksuniversiteit Groningen
(Niederlande)

- Carvon/Thymol/Linalool/Linalylacetat/Anethol-Test-
gemisch, Praktikumsreagenz, Institut für
Pharmazeutische Biologie, München

- Palustrol (angereicherte Fraktion) siehe Kap. III/1

2 *Toxicodendron radicans* (Allg. Teil, Kap.7)

2.1 Extrakte und Drogenmuster:

homöopathische Urtinktur "Rhus toxicodendron"

- Fa. Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe:

Ch.-Nr. 08851 ; Ch.-Nr. 32851 ;

Ch.-Nr. K 140 ; Ch.-Nr. 41861

- Fa. Stauffen-Pharma, Göppingen:

Ch.-Nr. 09 08 85

- Fa. Pascoe, Gießen:

Ch.-Nr. 129801

homöopathische Dilutionen D1, D2, D3 sowie Muster der
zur Herstellung der Urtinktur verwendeten Droge
- Fa. Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe

authentisches Muster von Toxicodendron radicans
- Dr. G. Heubl, Botanisches Institut der Universität
München

2.2 Vergleichssubstanzen:

- Urushiol, Prof. M.A. ElSohly, School of Pharmacy,
University of Mississippi (USA).
- Gallussäure, Fa. Roth, Karlsruhe
- Gallussäuremethylester und Gallussäureethylester,
Myricitrin, Quercitrin, Myricetin, Quercetin,
Fa. Roth, Karlsruhe
- β -Penta-O-galloyl-D-glucose, β -1,2,3,6-Tetra-O-
galloyl-D-glucose, β -1,3,6-Trigalloyl-D-glucose,
Prof. E. Haslam, Department of Chemistry, University
of Sheffield (Großbritannien).
- Acidum tannicum (DAB 7), Fa. Merck, Darmstadt

3 Extrakte, etherische Öle und Reinsubstanzen für pharmakolo- gische Screeninguntersuchungen (Allg. Teil, Kap. 5 und 7.2.4)

[soweit nicht bereits in Kap. 1 und 2 aufgeführt]

a) Extrakte:

- Trockenextrakte von Salix alba (1,65 % Salicin)
und von Salix purpurea (10 % Salicin), Dr. B. Meier,
Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich (Schweiz)

b) Etherische Öle:

- Aetherolea Cinnamomi (DAB 7), Pini pumilionis
(Erg.B.6), Pini silvestris (Erg.B.6), Juniperi
(DAB 6), Calami aetheroleum (DAB 6) bezogen von
Fa. Dragoco, Holzminden.
- Caryophylli aetheroleum DAB8, Fa. Mainland, Frankfurt

- Eucalypti aetheroleum (Ph.Eur.III) Fa. Voegelé, Laufen
- Oleum Sinapis, Fa. Caesar & Loretz, Hilden
- Asari europaeum aetheroleum, Fa. Carl Müller, Göppingen
- Aetherolea Matricariae, Ledi palustris, Rhododendri ferruginei aus Handelsware destilliert.
- Thymi aetheroleum, Rosmarini aetheroleum, Terebinthinae aetheroleum, Institutsbestände

c) Reinsubstanzen:

- Apiol, Acetegenol, Carvacrol, Chlorplumbagin, Cubebin, Cucurbitacin D, Lapachol, 4-Methoxysalicylsäuremethylester, 5-Methoxysalicylsäuremethylester, Plumbagin, Parthenolid und Thymol - aus der Institutssammlung.
- L-Bornylacetat, Cantharidin, (+)-Catechin, β -Caryophyllen, 1,8-Cineol, Citral, Cucurbitacin I, Curcumin, p-Cymen, Ellagsäure, Hamamelitannin, Salicylsäure, Fa. Roth, Karlsruhe
- Guajazulen, Fa. Riedel de Haen, Seelze
- Isoalantolacton und Ledol, R. Bos, Rijksuniversiteit Groningen (Niederlande)
- trans-Isoasaron, Fa. Carl Müller, Göppingen
- Helenalin, Ambrosin, Psilotropin und Parthenin, Prof. E. Rodriguez, University of California, Irvine (USA)
- D-Salicin, Salicortin, Salireposid und Isosalipurposid, Dr. B. Meier, Pharmazeutisches Institut der Eidgen. Techn. Hochschule Zürich (Schweiz)
- E,Z-Ajoen, 3-Vinyl-[4H]-1,2-dithiin, 2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin, Dr. E. Wolf, Fa. Klosterfrau, Köln
- Diallyldisulfid, Dimethyldisulfid, Eugenol, Gallussäureethylester, Piperin, (+)-Campher, (-)-Menthol, Salicylsäuremethylester, Menthol, Fa. Fluka, CH-Buchs
- Acetylsalicylsäure, Capsaicin, Dimethylsulfoxid, Fa. Merck, Darmstadt

- Indometacin, 4-Methoxysalicylsäure und 5-Methoxysalicylsäure, Fa. Sigma, Taufkirchen
- m-Digallussäure, m-Trigallussäure, Dr. M. Verve, Laboratory of Organic Chemistry, State University of Ghent, (Belgien)
- (-)-Catechin, (-)-Fisetinidol, (-)-Robinetindol, (+)-Mesquitol, (-)-Teracacidin, (+)-Mollisacacidin, (+)-Leucofisetinidin, (-)-Leucofisetinidin, [4,8]-3,4-trans-(-)-Fisetinidol-(+)-catechin, [4,8]-3,4-cis- " - " , [4,6]-3,4-cis- " - " und Phlobatannin von Prof. D. Ferreira, Department of Chemistry, University of Orange Free State, Bloemfontein (Südafrika)
- Geraniin, Pedunculagin, Chebulinsäure, Prof. T. Okuda, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University (Japan)
- Curcuminoide (siehe Kap. 5.3), Dr. P. B. Rasmussen, Department of Organic Chemistry, University of Aarhus (Dänemark)

II Allgemeine Arbeitsmethoden

1 Dünnschichtchromatographie

1.1 Adsorbentien

für die analytische DC:

Kieselgel 60 F 254-Fertigplatten 20x20 cm, Schichtdicke 0,25 cm, Fa. Merck, Darmstadt.

Kieselgel 60 F 254-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC) 10x10 cm, Fa. Merck, Darmstadt.

für die präparative DC:

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten, 20x20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, Fa. Merck, Darmstadt.

Die Fertigplatten wurden vor der präparativen Schichtchromatographie mit MeOH p.a., MeOH 70% und dem verwendeten Laufmittel vorentwickelt.

1.2 Laufmittelsysteme

a) Untersuchung von *Ledum palustre* (Kap. 6)

- L-1 (Etherisches Öl)
Toluol-Ethylacetat (76:14)
- L-2 (Terpene und Sterine)
Toluol-Aceton (80:20)
- L-3 (Cumaringlykoside)
Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:13:10)
- L-4 (Cumaringlykoside)
Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:25:10)
- L-5 (Flavonoid- und Cumaringlykoside)
Ethylacetat-Ameisensäure-Essigsäure-Wasser
(100:11:11:27)
- L-6 (Cumarinaglyka)
Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure (50:40:10)
- L-7 (Zucker)
Chloroform-Methanol-Wasser (64:40:8)

b) Untersuchung von *Toxicodendron radicans* (Kap.7)

- T-1 (Urushiöle):
Chloroform-MeOH (80:20)
- T-2 (Urushiöle):
Chloroform-Ethylacetat (90:10)
- T-3 (Urushiöle)
Chloroform-Ethylacetat-Ameisensäure (95:2,5:2,5)
- T-4 (Flavonoidglykoside):
Ethylacetat-Ameisensäure-Essigsäure-Wasser
(100:11:11:27)
- T-5 (Flavonoidaglyka):
Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure (50:40:10)
- T-6 (Zucker):
Chloroform-Methanol-Wasser (64:40:8)

1.3 Detektionsmittel

- Det-1 (Terpene und Sterine):
Vanillin-Schwefelsäure
Nach Besprühen mit 5 % ethanol. H_2SO_4 und 1 % ethanol.
Vanillinlsg. wird 10 min bei 110 °C erhitzt und im
Tageslicht ausgewertet
- Det-2 (Phenole):
Echtblausalz
0,5 g Echtblausalz (3,3'-Dimethoxy-biphenyl-4,4'-
bis(diazonium)-dichlorid in 100 ml H_2O lösen;
Auswertung im Tageslicht
- Det-3 (Flavonoide und Pflanzensäuren):
Naturstoffreagens nach NEU (1 %ig in MeOH), mit PEG
400-Lsg. (5 %ig in Ethanol) nachbesprühen.
Auswertung im Tageslicht und im UV 365 nm.
- Det-4 (Phenole):
 $FeCl_3$ (5 %ig in 0,1 N HCl)
- Det-5 (Zucker):
2 ml Anilin, 2 g Diphenylamin und 10 ml H_3PO_4
(85 %) werden gemischt und mit Methanol auf 100 ml
aufgefüllt (Phosphoräure zuerst in einem Teil
Methanol lösen). Nach Besprühen 10 min auf 100 °C
Erhitzen und Auswertung im Tageslicht.

2 Säulenchromatographie

2.1 Adsorbens: Kieselgel 60, Korngröße < 230 mesh,
Fa. Merck, Darmstadt

2.2 Pack- und Verfahrenstechnik:

Das Kieselgel wurde mit dem Elutionsmittel auf dem Magnet-
rührer zu einer gleichmäßigen, luftblasenfreien Suspension
gerührt (60 min). Die Suspension wurde dann in die schräg-
gestellte Säule, die unten etwas Elutionsmittel enthielt,
zügig und luftblasenfrei gegossen. Nach dem Aufrichten der
Säule wurde der Hahn geöffnet und mit Elutionsmittel so
lange gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb. Die
Extrakte wurden in möglichst wenig Elutionsmittel gelöst

und auf die dem Extraktgewicht entsprechende Menge Kieselgur (Fa. Aldrich, Steinheim) aufgezogen. Die getrocknete Masse wurde gleichmäßig auf der Säulenoberfläche verteilt. Mit Hilfe eines in Elutionsmittels eintauchenden Scheidetrichters, der ein Lösungsmittelreservoir enthielt und an den ein leichter Unterdruck angelegt worden war, wurde die Elutionsmittelmenge über der Säule konstant gehalten. Die Trennung wurde mittels einem UV-Hochdruckstrahler 366 nm (Fa. Desaga, Heidelberg) verfolgt und das Eluat mittels eines Fraktionsschneiders aufgefangen.

3 Mitteldruck-Säulenchromatographie (MPLC)

Säule: Büchi B 685, Höhe 46 cm, ID 26 mm

Pumpe: Gilson Modell 303

Adsorbens: Reversed phase-C₈-Material

Polygosil 60-2540 C₈, Korngröße 25-40 µm,

Fa. Macherey & Nagel, Düren

Elutionsmittel: Wasser-MeOH (92:8)

Detektion: UV-Strahler 366 nm, Fa. Desaga, Heidelberg

Die Probenaufgabe erfolgte im Elutionsmittel (5ml).

4 HPLC

4.1 Apparative Daten:

Gerät a)

Liquid Chromatograph HP 1090 mit HP 1040 A Photodiodenarray-Detektor, kombiniert mit HP 85 B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470 A Plotter (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)

Gerät b)

Pumpen: 6000 A (Fa. Waters, Eschborn)

Gradientenprogrammer: M 660 (Fa. Waters)

Einspritzteil: WISP 710 B (Fa. Waters)

UV-Detektor : LC 75 (Fa. Perkin Elmer)

Datensystem : M 730 (Fa. Waters)

Radioaktivitätsmonitor: LB 503 (Fa. Berthold, Wildbad)

Durchflußmeßzelle: H 130 U3 (Fa. Berthold)
Radiochromatographie-Datensystem: LB 500 (Fa. Berthold)

4.2 Lösungsmittel:

Acetonitril (Chrom AR-Qualität), Fa. Promochem, Wesel
destilliertes Wasser

4.3 Trennsysteme:

- HPLC-PGS1: Trennung der Prostaglandine im
Prostaglandinsynthesetest

Fließmittel A: Acetonitril-Wasser (30:70)

Fließmittel B: Acetonitril-Wasser (80:20)

jeweils unter Zusatz von 10 ml 0,1 N H_3PO_4 /l

Gradient: von 0% B nach 100 % B unter linearem

Anstieg, dann 12 min 100 % B

Detektion: Radioaktivitätsmonitor

- HPLC-PGS2: Trennung der Prostaglandine im Prostaglandin-
synthesetest bzw. Arachidonsäuremetaboliten
aus Humanthrombozyten

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser (36:64)

B: Acetonitril-Wasser (80:20)

jeweils unter Zusatz von 10 ml 0,1 N H_3PO_4 /l

Gradient: 11 min 100 % A, dann 15 min 100 % B

Detektion: Radioaktivitätsmonitor

- HPLC-L 1: Trennung der Cumarinaglyka und
Cumaringlykoside von *Ledum palustre*

Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril

jeweils unter Zusatz von 10 ml 0,1 N H_3PO_4 /l

Gradient: von 10 % B nach 35 % B in 30 min
linearer Anstieg

Detektion: 330 nm, 210 nm

- HPLC-T 1: Trennung der Flavonolglykoside und Gallussäurederivate von Toxicodendron radicans

Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0,1 N H_3PO_4 /l
Gradient: von 3 nach 40 % B in 30 min
linearer Anstieg
Detektion: 280 nm

- HPLC-T 2: Trennung der Urushiole von Toxicodendron radicans

Fließmittel: A:Wasser B:Acetonitril
jeweils unter Zusatz von 10 ml 0,1 N H_3PO_4 /l
Gradient: von 70% B auf 95 % B in 20 min
linearer Anstieg
Detektion: 210 nm, 192 nm, 254 nm und 280 nm

Für alle Trennungen wurde verwendet:

- _ Säule: Hibar 125-4 LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ m)
(Fa.Merck, Darmstadt)
- _ Durchfluß: 1 ml/min

5 Gaschromatographie

Gerät: Perkin Elmer Sigma 1B
Trärgas: Argon
Detektor: FID
Temperatur und Säulen siehe Kap. III/1 und III/2

6 Spektroskopische und physikalische Methoden

6.1 Schmelzpunkte

Kofler-Heizbank der Fa. Reichert, Wien,
Die Werte sind unkorrigiert angegeben.

6.2 Optische Drehung:

Polarimeter LEP A 2, Fa. Zeiss
(Lösungsmittel: MeOH p.a.)

6.3 UV-Spektren

DB-GT UV-Spektrometer, Fa. Beckman
550 SE UV/VIS Spektrophotometer, Fa. Perkin Elmer
(Schichtdicke: 1 cm; Lösungsmittel MeOH p.a.)
Photodiodenarraydetektor HP 1040 A
(während der HPLC-Trennungen on-line aufgenommene
UV-Spektren)

6.4 IR-Spektren

Acculab-1 Spektrophotometer, Fa. Beckman
(Preßling 1mg/ 100 mg KBr)
FT-IR Spektrophotometer PE 1750, Fa. Perkin-Elmer
(Preßling 50 µg/20 mg KBr)

6.4 Massenspektren

_ EI-MS: Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos
_ GC/MS: Carlo Erba (Mailand) Kratos MFC 500 direkt gekop-
pelt mit Massenspektrometer
Kratos MS 80 RFA
Trärgas: 0,9 ml Helium/min
Split 1:10 ; Energiequelle 70 eV
verwendete Säulen und Temperaturprogramme
siehe Kap. III

- FAB-MS: a) Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos
FAB-Quelle: Xenon, 7-8 kV, 10 W
Matrix: Glycerin
(Institut für Pharmazeutische Biologie, München)
- b) Massenspektrometer MS 50 RF, Fa. Kratos
(Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in
Braunschweig)
FAB-Quelle: Xenon 6-8 kV
Matrix: Glycerin
Hochauflösung durch "peak matching"

6.5 ^1H -NMR-Spektren

Kernresonanzspektrometer WP-80 (80 MHz), Fa. Bruker
Kernresonanzspektrometer (300 MHz) *)
Kernresonanzspektrometer AM-360 (360 MHz), Fa. Bruker

6.6 ^{13}C -NMR-Spektren

Kernresonanzspektrometer WP-80 (20,15 MHz), Fa. Bruker
Kernresonanzspektrometer AM-360 (90,56 MHz), Fa. Bruker

*) Wir danken Herrn Dr. A. Neszmelyi,
Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest,
für die Aufnahme eines 300 MHz-Spektrums

III Spezielle Arbeitsmethoden:

1 Phytochemische Untersuchungen von *Ledum palustre*

Wasserdampfdestillation: 50 g fein geschnittene Droge
wurden in eine Neo-Clevenger-Apparatur mit 500 ml Wasser
in einem 1 l-Rundkolben 150 min einer Wasserdampfdestilla-
tion unterworfen. Wir erhielten 0,24 g etherisches Öl =
0,48 % Ausbeute. Das auf diese Weise gewonnene Öl wurde
pharmakologisch getestet und fraktioniert.

Fraktionierung: 100 mg des etherischen Öles wurden mit n-Pentan verdünnt und auf 5 Kieselgelfertigplatten (0,5 mm Schichtdicke) aufgetragen. Nach schonendem Abföhnen des Lösungsmittels wurden die Platten im Laufmittel L-1 entwickelt. Nach dem Abföhnen des Laufmittels wurden die Platten am Rand mit Det-1 detektiert. Das Erhitzen der Zonen erfolgte hierbei mit einer Heißluftpistole (Fa. Bosch). Die Fraktionen wurden, wie in Kap 6.1 abgebildet, markiert und nach dem Ausschaben der Zonen 3 mal mit 50 ml Ethylacetat p.a. auf dem Magnetprüher eluiert. Die vereinigten Eluate der Fraktionen wurden bei 30 °C am Rotationsverdampfer einrotiert.

Ausbeuten: Fraktion 1: 9 mg
Fraktion 2: 12 mg
Fraktion 3: 17 mg
Fraktion 4: 8 mg

Gaschromatographische Untersuchung des etherischen Öles und der Fraktionen:

Säule: Kapillarsäule CP Sil 5 CB, 0,23 mm ID,
Chrompack, 25 m
Injektortemp.: 250 °C
Detektortemp.: 250 °C
Einspritzmenge: 1 µl
Temperaturprogramm: 90 °C (5min) - 200 °C (10 min)
Aufheizrate: 5 °C / min

Gaschromatographische-massenspektroskopische (GC/MS)-
Untersuchung der Fraktion 3:

Gerät siehe II/6

Säule: a) OV 225 Kapillarsäule, 0,23 mm ID, Chrompack
14024, 25 m

b) OV 1-FS Kapillarsäule, 0,32 mm ID, Macherey
& Nagel, 50 m

Einspritzblock: a) 250 °C b) 200 °C

Interface: 200 °C

Temperaturprogramm: 90 °C (5min) - 200 °C (10 min)

Aufheizrate: 5 °C/min

Anreicherung von Palustrol:

50 g Herba Ledi palustris wurden in einer Neo-Clevenger-Apparatur 2 h einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Wir erhielten ca. 100 mg etherisches Öl, das auf Kieselgelfertigplatten (0,5 mm Schichtdicke) chromatographiert wurde. Durch Detektion mit Reagenz Det-1 am Rande der Platte konnte bei $R_f = 0,7$ eine violette Hauptzone markiert werden. Das Kieselgel im Bereich dieser Zone wurde ausgeschabt, pulverisiert und in einer kleinen Säule mit je 100 ml Ethylacetat und Diethylether p.a. eluiert. Nach dem Einrotieren bei 30 °C erhielten wir ca. 7 mg ölige Flüssigkeit.

Durch GC/MS-Analyse wurde der Hauptpeak als Palustrol identifiziert (Bedingungen b) siehe oben, Fragmentierung siehe unten)

Physikalische Daten:

1. Carvacrol $C_{10}H_{14}O$ (150,10)

DC: R_f 0,69 (LM L-1)

GC: $R_t = 17,82$ min (CP Sil 5 CB, Temp.-programm s.o.)

GC/MS: (Bedingungen s.o.); m/z (rel. Int. %) =
150 (35), 135 (100), 121 (4), 107 (9), 91 (18),
77 (10), 65 (6), 51 (5)

2. Palustrol $C_{15}H_{26}O$ (222,20)

DC: R_f 0,74 (LM L-1)

GC: $R_t = 25,94$ min (CP Sil 5 CB, Temp.-programm s.o.)

GC/MS: (Bedingungen s. o.); m/z (rel. Int. %) =
222 (9), 204 (45), 189 (13), 165 (13), 161 (39),
147 (29), 122 (96), 111 (100), 109 (41), 107 (44),
105 (30), 95 (44), 93 (35), 83 (33), 81 (45),
69 (40), 67 (35), 55 (54), 43 (27), 41 (74)

Mikrohydrolysen auf der DC-Platte:

Zwei DC-Platten, auf die der MeOH-Extrakt aufgetragen worden war, wurden im Laufmittel L-4 entwickelt.

Nach dem Abföhen des Laufmittels wurden die DC-Platten 1 h bei 100 °C in einer mit HCl-Dampf gesättigten Kammer belassen. Nach Vertreiben des HCl-Dampfes durch intensives Föhen (2h) wurde eine Platte im Aglykonlaufmittel L-6, die andere im Zuckerlaufmittel L-7 mit Referenzsubstanzen entwickelt. Die Detektion der Aglyka erfolgte im UV 365 nm, die Detektion der Zucker mit Det-5.

Herstellung des Methanolextraktes:

300 g gepulverte Droge wurden am Soxhlet nacheinander mit Petrolether (8h), CHCl_3 (72 h) und Methanol (50 h) extrahiert. Nach dem Einengen wurden 33,5 g klebriger Methanolextrakt erhalten.

Anreicherung von Substanz A und Isolierung von Substanz B:

20 g Methanolextrakt wurden wie in II/2 beschrieben auf Kieselgur aufgezogen und an Kieselgel (Säulenfüllhöhe 23 cm, ID 7,5 cm) chromatographiert.

Als Eluens diente eine Mischung aus Ethylacetat, Methanol und Wasser (100:20:10). Die Trennung wurde mittels eines UV-Strahlers UV 366 nm verfolgt und die Fraktionen mit Hilfe eines Fraktionsschneiders aufgefangen. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 4 ml/min. Die zuerst eluierende, blauviolett fluoreszierende Zone enthielt Substanz A. Die anschließend eluierende, blaugrün fluoreszierende breite Zone von Substanz B lieferte nach dem Einrotieren 130 mg eines rötlich gefärbten Pulvers, aus dem nach Waschen mit eiskaltem Methanol 103 mg eines weißen Pulvers erhalten wurden. Erneutes Umkristallisieren aus MeOH p.a. erbrachte durchsichtige Nadeln.

Isolierung von Substanz N:

Nach Elution der Substanz B wurde bei gleichbleibender Tropfgeschwindigkeit das Mischungsverhältnis des Eluens geändert: Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:30:15). Die nach einiger Zeit eluierende Zone N (wie A blauviolett fluoreszierend) wurde aufgefangen und wegen ihrer Instabilität bei max. 40 °C am Rotationsverdampfer schonend eingengt. Aus dieser angereicherten Fraktion fielen in der Kälte Kristalle von Saccharose aus. Der Überstand (5ml) wurde einer Nachreinigung über Mitteldruckchromatographie (MPLC, Kap. II/5) an reversed-phase-Material unterworfen. Als Eluens diente eine Wasser-Methanol-Mischung (92:8). Nach Gefriertrocknung wurden 15 mg Substanz N erhalten.

Physikalische Daten:

1. Esculin (Substanz A): $C_{15}H_{16}O_9$ (340,28)
6,7-Dihydroxycumarin-6- β -D-glucopyranosid
DC: Rf 0,37 (LM L-3), 0,45 (LM L-5)
HPLC: Rt = 4,03 min (TS HPLC-L1)
UV (Diodenarray): $\lambda_{max.}$ = 223, 248, 297, 335 nm
Mikrohydrolyse: Esculetin, D-Glucose
2. Fraxin (Substanz B) $C_{15}H_{18}O_{10}$ (370,30)
7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin-8- β -D-glucopyranosid
Smp.: 203-204 °C (Nadeln aus MeOH) [Lit.(172): 205 °C]
DC: Rf 0,30 (LM L-3), 0,32 (LM L-5)
HPLC: Rt = 6,29 min (TS HPLC L-1)
OR: $[\alpha]_D^{25} = +28,5^\circ$ (c = 0,769 in MeOH)
UV: $\lambda_{max.}/MeOH$ (log ϵ) = 341 (4,01), 305 (sh, 3,84),
255(sh, 3,71), 226 (4,26) nm

IR: (KBr) ν = 3380 (breit, OH), 2930, 1710 (C=O),
1610 (C=C), 1580, 1500 (Ar), 1450,
1415, 1305, 1075, 1020, 845 cm^{-1}

FAB(+)-MS: + LiCl; [Matrix: Glycerin]; m/z (rel. Int. %) =
377 (8) [M + Li]⁺, 209 (9) [Aglykon + H]⁺

FAB(-)-MS: [Matrix Glycerin]; m/z (rel. Int.) =
369 (28) [M-H]⁻
207 (16) [Aglykon-H]⁻
165 (4)

EI-MS: (70 eV); m/z (rel. Int. %) =
208 (100)=Aglykon, 193 (33), 180(13), 165 (12),
137 (15), 109 (14), 81 (15), 73 (23), 60 (35)

¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆+TFA-d₆, TMS int.) δ (ppm) =
3,2-3,75 (m, ~~bx~~, 6H, Glc-H)
3,85 (s, 3H, OCH₃)
5,0 (d, 1H, J = 7 Hz, H-1')
6,28 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H-3)
7,05 (s, 1H, H-5)
7,90 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H-4)

¹³C-NMR: (20,15 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) =
160,30 (s, C-2), 145,55 (s, C-6), 144,82 (d,
C-4), 143,81 (s, C-7), 142,80 (s, C-9), 131,69
(s, C-8), 112,34 (d, C-3), 110,27 (s, C-10),
105,16 (d, C-5), 104,10 (d, C-1'), 77,45 (d,
C-3'), 76,39 (d, C-5'), 74,03 (d, C-2'), 69,82
(d, C-4'), 60,96 (t, C-6'), 56,25 (q, OCH₃)

3. Substanz N: $C_{21}H_{24}O_{13}$ (484,12)

DC: Rf 0,12 (LM L-3), 0,49 (LM L-5)

HPLC: Rf = 8,46 min (TS HPLC-L-1)

Mikrohydrolyse: Esculetin, D-Glucose

UV: $\lambda_{max.}/MeOH$ (log ϵ) = 225 (4,06), 247 (3,63), 296 (3,75),
334 (4,06) nm

IR (KBr): ν = 3360 (breit, OH), 2940, 1750-1710 (br, C=O),
1680(C=O), 1610 (C=C), 1565, 1510, 1440, 1395,
1300, 1255, 1140, 1070, 820 cm^{-1}

FAB(-)-MS: [Matrix: Glycerin]; m/z (rel. Int. %) =
483 (28) [M-H]⁻, 413 (10), 345 (13), 339 (12),
335 (18), 321 (17), 297 (16), 205 (19)

Hochauflösung: FAB(-)-MS: gef. 483,1145 ; ber. 483,1139

EI-MS: (der unter Abspaltg. des Acylrestes
permethylierten Verbindung)
(70 eV); m/z (rel. Int. %) =
456 (21) [= Permethylesculinsäure], 438 (5),
425 (3), 238 (62), 218 (54), 207 (32),
187 (52), 155 (43), 111 (64), 71 (71)

¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆ + TFA-d₆, TMS int.); δ (ppm) =
1,25 (s_{bx}), 2,65 (s_{bx}), 3,2-4,6 (m_{bx}), 4,84
(d_{bx}, 1H, J= 7 Hz, H-1'), 6,22 (d, 1H, J=10 Hz,
H-3), 6,91 (s, 1H, H-5), 7,36 (s, 1H, H-8),
7,90 (d, 1H, J=10 Hz, H-4)

(300 MHz, DMSO-d₆+CDCl₃, TMS int.); 80 °C:
 δ (ppm) = 1,29 (s, 3H), 2,65 und 2,60 (AB-
System, 2 H, J= 14,4 Hz, -CH₂), 3,0-3,5 (br,
Glc-H und OH), 3,67 (m, 1H, H-4'), 4,12 (dd,
1H, J₁ = 11,8 Hz, J₂ = 6,6 Hz, H-6'), 4,43 (dd,
1H, J₁ = 11,8 Hz, J₂ = 2,3 Hz, H-6'), 4,76 (d,
1H, 7,3 Hz, H-1'), 6,16 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H-
3), 6,78 (s, 1H, H-5), 7,30 (s, 1H, H-8), 7,81
(d, 1H, 9,5 Hz, H-4)

^{13}C -NMR: (90,56 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + \text{TFA}-d_6$); δ (ppm)=

172,8 (C=O), 170,9 (C=O), 160,9 ($\text{C}_2=\text{O}$), 151,5 (C-5), 151,0 (C-9), 144,7 (C-4), 142,3 (C-6), 115,3 (C-5), 112,6 (C-3), 111,2 (C-10), 103,6 (C-8), 102,3 (C-1), 79,4, (quart. C), 75,9 (C-3'), 74,5 (C-5'), 73,4 (C-2'), 70,2 (C-4'), 69,3 (CH_2OH), 63,7 (C-6'), 45,6 (CH_2), 28,3 (CH_3)

2 Phytochemische Untersuchungen von Toxicodendron radicans

Fraktionierung der Urtinktur:

Die homöopathische Urtinktur (5 ml) wurde 1:1 mit Wasser verdünnt und nacheinander gegen je 10 ml CHCl_3 p.a., Ethylacetat p.a und wassergesättigtes n-Butanol ausgeschüttelt. Nach dem Einrotieren zur Trockne erhielten wir 26 mg Chloroform- und 17 mg Ethylacetatfraktion sowie je 7 mg Butanolfraktion bzw. wässriger Rest.

Herstellung der PMTS-Urushirole:

a) 1 mg Urushiol-Referenzgemisch wurde in wenig Pyridin gelöst und mit einem Silylierungsgemisch BAS/TMCS/TMSIM 3h silyliert. Ca. 0,2 μl dieser Lösung wurden zur GC/MS-Analyse verwendet.

b) 5 mg der CHCl_3 -Fraktion wurden in 1 ml Ethanol p.a. gelöst und über SEPPAK- C_{18} -Kartuschen (Fa. Waters) vorge-reinigt. Die Kartusche wurde beladen, mit 6ml 50 % Acetonitril gespült. Anschließend wurde die urushiolhaltige Fraktion mit 100 % Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeeengt und in 50 μl Pyridin gelöst. Die Silylierung erfolgte mit 250 μl BSTFA unter Zusatz katalytischer Mengen an HMCDs. Überschüssiges Reagens und Lösungsmittel wurden im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 50 μl Dichlormethan aufgenommen. Ca 1 μl dieser Lösung wurden zur GC/MS-Analyse verwendet.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung
der PMTS-Urushirole

(Referenzgemisch und Chloroformfraktion):

a)

Säule: CP Sil 19 CB Kapillarsäule, 0,23 mm ID, Chrompack,
25 m

Injektor: 300 °C

Interface: 250 °C

Temperaturprogramm: 200 °C (3 min) - 300 °C
linearer Anstieg 5 °C/min

b)

Säule: OV 225 Kapillarsäule, 0,23 mm ID, Chrompack
14024,25 m

Injektor: 220 °C

Interface: 210 °C

Temperaturprogramm: 150 °C (3 min) - 210 °C
linearer Anstieg 5 °C/min

Physikalische Daten

1. Urushiol 15:2 (n-4) $C_{21}H_{32}O_2$ (316,49)

3-Pentadecadienyl-8',11'-catechol

DC: Rf 0,8-0,9 (LM T-1)

HPLC: Rt = 12,52 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{max.}$ = 199, 219 (sh), 277 nm

GC-MS: als PTMS-Urushiol; m/z (rel. Int. %) =
460 (43), 445 (2), 267 (10), 179 (39);

2. Urushiol 15:1 (n-7) $C_{21}H_{34}O_2$ (318,50)

3-Pentadecenyl-8'-catechol

DC: Rf 0,8-0,9 (LM T-1)

HPLC: Rt = 16.17 min (TS HPLC T-1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{max.}$ = 199, 219 (sh), 277 nm

GC-MS: als PTMS-Urushiol; m/z (rel. Int. %) =
462 (18) [M⁺], 447 (3), 267 (10), 179 (39);

Isolierung von Myricitrin und Quercitrin:

Mit 50 mg des n-Butanolextraktes wurde eine präparative Dünnschichtchromatographie im LM T-4 durchgeführt (4 DC-Platten). Die Zonen A und B wurde im UV 365 nm markiert, ausgeschabt und mit MeOH p.a. eluiert. Ausbeute: ca. 7 bzw. 2 mg. Zur weiteren Aufreinigung verwendeten wir eine Sephadex-LH 20-Säule (Fa. Pharmacia). Als Laufmittel diente MeOH p.a. (Säulenfüllhöhe: 13 cm, ID 2 cm). Ausbeute: 4 bzw. 0,5 mg.

Mikrohydrolysen:

Verfahren wie bei III/1 beschrieben. Entwicklung des Extraktes im Laufmittel T-4. Die Zweitentwicklung erfolgte für die Aglyka im Laufmittel T-5 und für die Zucker im Laufmittel T-6. Die Detektion erfolgte mit Det-3 bzw. Det-5.

Physikalische Daten

1. Flavonolglykosid A: Myricitrin $C_{21}H_{20}O_{12}$ (464,38)

Myricetin-3-L-rhamnopyranosid

Mikrohydrolyse: Myricetin, L-Rhamnose

DC: Rf 0,55 (LM T-4), 0,45 (LM T-1)

HPLC: Rt = 16,14 min (TS HPLC T-1)

UV (Diodenarray): λ_{max} . 260, 304 (sh), 349 nm

UV: (MeOH) λ_{max} . = 255, 305 (sh), 350 nm

(+NaOAc, H_3BO_3) 257, 297, 370 nm

(+AlCl₃) 270, 313, 420 nm

(+AlCl₃/HCl) 270, 308, 360 (sh), 400 nm

IR: (KBr) ν = 3400 (br, OH), 2920, 1660, 1610, 1500, 1450, 1355, 1300, 1200, 1165, 1090, 1060, 960, 840, 815, 670 cm^{-1}

2. Flavonolglykosid B: Quercitrin $C_{21}H_{32}O_{11}$ (448,37)

Quercetin-3-L-rhamnopyranosid

Mikrohydrolyse: Quercetin, L-Rhamnose

DC: Rf 0,66 (LM T-4), 0,5 (T-1)

HPLC: Rt = 18,53 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\max.}$ = 256, 348 nm

3. Gallussäure

DC: Rf 0,1-0,15 (LM T-1)

HPLC: Rt = 4,13 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\max.}$ = 217, 273 nm

Retentionszeit und UV-Spektrum in Übereinstimmung
mit authentischer Referenzsubstanz

4. Gallussäureethylester

DC: Rf 0,9 (LM T-1)

HPLC: Rt = 13,75 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\max.}$ = 217, 273 nm

Retentionszeit und UV-Spektrum in Übereinstimmung
mit authentischer Referenzsubstanz

5. β -1,2,3,6-Tetraalloyl-D-glucose

HPLC: Rt = 15,67 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\max.}$ = 217, 279 nm

Retentionszeit und UV-Spektrum in Übereinstimmung
mit authentischer Referenzsubstanz

6. β -Pentaalloyl-D-glucose

HPLC: Rt = 17,39 min (TS HPLC-T1)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\max.}$ = 217, 279 nm

Retentionszeit und UV-Spektrum in Übereinstimmung
mit authentischer Referenzsubstanz

IV Pharmakologische Untersuchungen

1 Prostaglandinsynthesetest

Materialien:

Arachidonsäure, Fa. Sigma, Taufkirchen

[1-¹⁴C]-Arachidonsäure (50mCi/mmol), Fa. New England

Nuclear, Dreieich,

Referenzsubstanzen PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α}, Fa. Sigma, Taufkirchen

Referenzsubstanzen 12-HHT, 12-HETE, 11-HETE, Dr. P. Kuhl, Fa. Nattermann, Abt. Biochem. Forschung, Köln

Enzym-Präparation Methode E1):

Zur Erfassung der Prostaglandinsynthesaktivität wurde die Mikrosomenfraktion aus Schafsamenblasen nach der von NUGTEREN und HAZELHOF angegebenen Methode (19) isoliert. Die Schafsamenblasen wurden gereinigt, mit drei Volumenteilen einer 1 mM EDTA-Lösung in 0,1 M-KH₂PO₄-Puffer (pH 7,4) mit dem Ultra Turrax-Mixer homogenisiert. Das Homogenisat wurde Ultraschall-behandelt und durch Gaze filtriert, das Filtrat bei 4000 g zentrifugiert (10 min, 4 °C der Überstand erneut, diesmal bei 105000 g 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in demineralisiertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat enthielt 35% Protein. Die Präparation war mindestens sechs Monate in tiefgefrorenem Zustand ohne größere Aktivitätsverluste haltbar.

Enzympräparation Methode E2):

Herstellung des 105 000 g Pellets wie bei Methode 1), dann Suspendierung in KH₂PO₄-Puffer (pH 7,4).

Die Suspension war bei -70 °C mindestens 1 Jahr ohne größere Aktivitätsverluste lagerfähig.

Über die Enzympräparationen siehe auch Kap. 3.3.

Inkubation:

Die Inkubation wurde in der von KUHLE et al. (47) ausgearbeiteten Form durchgeführt: Der Testansatz enthielt die

Enzympräparation in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0.
[2 mg der nach E1) hergestellten Enzympräparation in 2,635 ml Endvolumen oder 5,3 µg-10 µg Protein von Präparation E2 in 2 ml Endvolumen]. Weiterhin enthielt der Ansatz 1mM reduziertes Glutathion (Fa. Merck, Darmstadt), 1mM Adrenalinbitartrat (Fa. Caesar & Loretz, Hilden) und 0,05 mM EDTA.

Die Inhibitoren wurden in 50 µl Ethanol p.a. oder Tris-HCl-Puffer gelöst (ggf. in DMSO angelöst) hinzugefügt und 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von [$1-^{14}C$]-Arachidonsäure (0,1 µCi abs.) gestartet.

Anschließend wurde unter Schütteln 20 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zusatz von 525 µl 1 % Ameisensäure und Eiskühlung wurde die Reaktion gestoppt und das Inkubat zweimal mit je 4 ml Ethylacetat extrahiert. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert. Die organische Phase wurde unter Stickstoffatmosphäre am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 100 µl Ethanol p.a. aufgenommen. Davon wurden 15 µl zur HPLC-Analyse verwendet.

HPLC siehe II/4 mit Gerät a);

Trennsystem: HPLC-PGS 1 oder HPLC-PGS 2

Auswertung: siehe Allgem. Teil Kap. 2.3.1

2 Cyclooxygenasetest

Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit Frau Dr. G. Degen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. D. Henschler) durchgeführt.

Die Cyclooxygenaseaktivität wurde über die Messung des Arachidonsäure-abhängigen Sauerstoffverbrauchs in einer thermostatisierten 2,0 ml-Zelle gemessen, die eine "Clark-type"-Elektrode (Yellow Springs Instruments Oxygen Monitor Modell 53) enthielt. Der Inkubationsansatz enthielt die Schafsamenblasenpräparation (entsprechend 0,2 mg Protein) in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,6). Nach Zugabe des in DMSO

oder Puffer gelösten Inhibitors wurde 2 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Arachidonsäure (70 µM, sofern nicht anders angegeben) gestartet. Die Anfangsgeschwindigkeit der Arachidonsäureoxygenierung wurde über eine Tangente an die Sauerstoffsverbrauchskurve (linearer Bereich) ermittelt.

3 Cooxidationsuntersuchungen (Kap. 3.2 u. 6.2.3.2)

Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit Frau Dr. Degen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. D. Henschler) durchgeführt. Experimentelle Details siehe (69,70).

Arachidonsäure 100 µM, 0,5 mg mikrosomales Protein/ml in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

a) Carvacrol (Kap. 3.2):

Carvacrol 20 µM

Bestimmung des Carvacrols vor und nach der Inkubation über reversed-phase-HPLC

(Säule: Zorbax ODS II) Säule. Detektion: 275 nm.

b) Esculetin (Kap. 6.2.3.2):

Esculetin 56 µM,

Bestimmung des Esculetins vor und nach der Inkubation über reversed-phase-HPLC.

Detektion : 350 nm

Weitere Ansätze enthielten jeweils zusätzlich H₂O₂ (185 µM) bzw. Indomethacin (70 µM)

4 Arachidonsäuremetabolismus in Humanthrombozyten

Isolierung von Humanthrombozyten:

- _ Lösung A: 0,35 g NaCl; 3,42 g EGTA ; bidest. Wasser auf pH 7,4 einstellen; Endvol.: 100 ml
- _ Lösung B: 1,45 g Tris; 0,57 g EGTA; 7,88 g NaCl; 1 g Glucose; bidest. Wasser; pH auf 6,5 einstellen; Endvol.: 1000 ml
- _ Lösung C: 25 mM Phosphatpuffer pH 7,4

5 x 10 ml Humanblut werden in Polyethylenspritzen, die je 1 ml Lsg. A enthalten, von Spendern, die 8 Tage lang keine Medikamente eingenommen hatten, abgenommen. Jeweils 25 ml Blut wurden in Polyethylenröhrchen vereinigt. Nach Zugabe von je 10 ml 0,9 % NaCl-Lsg. wurde gemischt und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und erneut zentrifugiert (15 min, 650 x g).

Das erhaltene Pellet wurde mit 10 ml Lsg. B gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, 650 x g) wurde das erhaltene Pellet in 30 ml Lsg. C gebracht, gemischt und mit Phosphatpuffer auf 10^6 Zellen /ml eingestellt (Anfärbung mit 2% Novocain-Lsg.). Bis zur Inkubation wurde die Thrombozytensuspension im Eisbad aufbewahrt.

Inkubation: Die Testsubstanz (gelöst in max. 20 µl Ethanol p.a.) wurde mit 2 ml Thrombozytensuspension 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von [$1-^{14}C$] Arachidonsäure (gemischt mit unmarkierter Arachidonsäure; Endkonz.: 2,5 µM) wurde die Reaktion gestartet und unter Schütteln 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1% Ameisensäure unter Eiskühlung gestoppt. Anschließend wurden die gebildeten Arachidonsäuremetaboliten zweimal mit je 4ml Chloroform-Methanol (1:1) extrahiert, zur Trockne eingeeengt und in 100 µl Ethanol aufgenommen. Zur HPLC-Analyse wurden 15 µl dieser Lösung verwendet.

HPLC-Trennsystem: HPLC-PGS 2

Auswertung: wie Prostaglandinsynthesetest

5 Thromboxanbestimmung durch Radioimmunoassay (RIA)

Die Untersuchungen wurden von Dr. med. habil. W. Dorsch an der Polyklinik der Universität München durchgeführt nach der bei (52) beschriebenen Methode durchgeführt.

6 5-Lipoxygenasetest (Kap. 2.5)

Diese Untersuchungen wurden in unserem Arbeitskreis mit PMNL, die aus Schweineblut isoliert wurden, durchgeführt (55). Die Zellen waren mit 10 μM ETYA, 2 mM CaCl_2 und 15 μM Ca-Ionophor A 23187 vorbehandelt. Nach Zusatz des Inhibitors u. [1^{14}C]-Arachidonsäure (1 μM) wurde 5 min bei 37 °C in Phosphatpuffer (pH 7,4) inkubiert. Extraktion und Auswertung erfolgten analog dem Prostaglandinsynthesetest. Weitere Details sind bei (55) beschrieben.

7 Chemilumineszenz-Test auf Radikalfängereigenschaften

Geräte: Biolumat LB 9505 mit Apple II e-Computer, Meß- und Auswertungsprogramm Fa. Berthold, Wildbad

Materialien:

- _ Veronalpuffer (5mM) pH 7,5-7,8
- _ Purin, Fa. Sigma, Taufkirchen
- _ Xanthinoxidase 0,42 U/ mg Protein, Fa. Sigma
- _ Luminol, Fa. Boehringer, Mannheim

Versuchsdurchführung:

Die Testsubstanz wurde in 10 % Ethanol gelöst und in verschiedenen Verdünnungen 20 min mit 0,6 mg Purin, 0,18 Units Xanthinoxidase und 0,2 mM Luminol bei 26 °C inkubiert. Die Chemilumineszenzantwort der Proben wurde im 6-Kanal-Gerät aufgezeichnet und in Form einer Kurve graphisch dargestellt. Durch Integration der Fläche unter den Kurven erhielt man die Intensität der Chemilumineszenzantwort in cpm. Die erhaltenen Werte der Proben wurden auf diejenigen der mitgeführten Kontrollinkubationen ohne Testsubstanz (als 100 %) bezogen.

A N H A N G

Häufig verwendete Abkürzungen:

AA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ETYA	Eicosatetraensäure
HHT	12-Hydroxy-heptadecatriensäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die für eine 50 %ige Enzymhemmung erforderlich ist.
LT	Leukotrien
MDA	Malondialdehyd
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PGS	Prostaglandinsynthase
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten
RIA	Radioimmunoassay
TX	Thromboxan

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) EDER, H. und GEDIGK, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie, 31. Auflage, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1984)
- 2) THEWS, G., MUTSCHLER, E. und VAUPEL P.: Anatomie - Physiologie - Pathologie, 2. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1982)
- 3) SCHRÖR, K.: Prostaglandine und verwandte Verbindungen, G. Thieme Verlag Stuttgart-New York (1984)
- 4) KIRCKPATRICK, C.J., MOHR, W. und HAFERKAMP, O.: Z. Rheumatol. 41, 89-99 (1982)
- 5) GOETZL, E.J. und GORMAN, R.R.: J. Immunol. 120, 526-531 (1978)
- 6) ROBINSON, D.R. und LEVINE, L.: in "Prostaglandin Synthetase Inhibitors" (Hrsg. H.J. Robinson, J.R. Vane) S. 223-229, Raven Press New York (1974)
- 7) EGG, D.: Z. Rheumatol. 43, 89-96 (1984)
- 8) BOMBARDIERI, S., CATTANI, P., CIABATTONI, G., DI MUNNO, O., PASERO, G., PATRONO, C., PINCA, E. und PUGLIESE, F.: Br. J. Pharmac. 73, 893-901 (1981)
- 9) MORLEY, J.: Lymphokine 4, 377-394 (1978)
- 10) BONTA, I.L. und PARNHAM, M.J.: Biochem. Pharmacol. 27, 1611-1623 (1978)
- 11) FORTH, W., HENSCHLER, D. und RUMMEL, W. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage, B.I.-Wissenschaftsverlag Mannheim (1980)
- 12) FENNER, H.: Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 1257-1264 (1984)
- 13) MIZUNO, K., YAMAMOTO, S. und LANDS, W.E.M.: Prostaglandins 23, 743-757 (1982)
- 14) HACKENTHAL, E.: Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 1977-1980 (1984)
- 15) KIUCHI, F., SHIBUYA, M., KINOSHITA, T. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 31, 3391-3396 (1983)
- 16) BAUMANN, J., BRUCHHAUSEN, F.V. und WURM G.: Prostaglandins 20, 627-639 (1980)
- 17) BAUMANN, J., WURM, G. und BRUCHHAUSEN, F.v.: Arch. Pharm. 313, 330-337 (1980)
- 18) WURM, G., BAUMANN, J. und GERES, U.: Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 2062-2078 (1982)
- 19) MICHEL, F., MERCKLEIN, L., REY, R. und CRASTES DE PAULET, A.: in "Flavonoids and Bioflavonoids" (Hrsg. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay), Budapest (1985), S. 389-401
- 20) SWIES, J., ROBAK, J., DABROWSKI, L., DUNIEC, Z., MICHALSKA, Z. und GRYGLEWSKI, R.J.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 36, 455-463, (1984) ref. nach C.A. 103: 16593
- 21) LANDOLFI, R., MOWER, R.L. und STEINER, M.: Biochem. Pharmacol. 33, 1525-1530 (1984)
- 22) KIMURA, Y., OKUDA, H., NOMURA, T., FUKAI, T. und ARICHI, S.: Chem. Pharm. Bull. 34, 1223-1227 (1986)
- 23) EVANS, A.T., FORMUKONG, E. und EVANS, F.J.: Biochem. Pharmacol. 36, 2035-2037 (1987)
- 24) BURSTEIN, S., LEVIN, E. und VARANELLI, C.: Biochem. Pharmacol. 22, 2905-2910 (1973)
- 25) BURSTEIN, S., VARANELLI, C. und SLADE, L.T.: Biochem. Pharmacol. 24, 1053-1054 (1974)
- 26) DEWHIRST, F.E.: Prostaglandins 20, 209-222 (1980)

- 27) DEWHIRST, F.E.: Dissertation, The University of Rochester, Rochester/New York (1979)
- 28) KIUCHI, F., SHIBUYA, M. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 30, 2279-2282 (1982)
- 29) KIUCHI, F., SHIBUYA, M. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 30, 754-757 (1982)
- 30) IWAKAMI, S., SHIBUYA, M., TSENG, C.F., HANAOKA, F. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 34, 3960-3963 (1986)
- 31) SANKAWA, U., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y., NOGUCHI, H., KINOSHITA, T. und IITAKA, Y.: Prostaglandins 24, 21-34 (1982)
- 32) LEMA, W.J., BLANKENSHIP, J.W. und MALONE, M.H.: J. Ethno-pharmacol. 15, 161-167 (1986)
- 33) KIMURA, Y., OKUDA, H., OKUDA, T. und ARICHI, S.: Planta med. 337-338 (1986)
- 34) WURM, G. und BAUMANN, J.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 31, 1673-1677 (1981)
- 35) WURM, G., BAUMANN, J., GERES, U. und SCHMIDT, H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 34, 652-658 (1984)
- 36) SPRONCK, H.J.W., LUTEIJN, J.M., SALEMINK, C.A. und NUGTEREN, D.H.: Biochem. Pharmacol. 27, 607-608 (1978)
- 37) KIMURA, Y., OKUDA, H. und ARICHI, S.: Planta Med. 132-136 (1985)
- 38) FLOWER, R.J. und VANE, J.R.: Biochem. Pharmacol. 23, 1439-1450 (1974)
- 39) SMITH, W.L.: in "Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism" (Hrsg. W.M.LANDS), Martinus Nijhoff Publishing, Boston (1985), S. 77-93
- 40) TANAKA, Y., WARD, S.L. und SMITH, W.L.: J. Biol. Chem. 262, 1374-1381 (1987)
- 41) YAMAMOTO, S.: in "Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism" (Hrsg. W.M.LANDS), Martinus Nijhoff Publishing, Boston (1985), S. 41-50
- 42) NUGTEREN, D.H. und CHRIST-HAZELHOF, E.: in "Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 6" (Hrsg. B.Samuelsson, P.W. Ramwell, R. Paoletti), Raven Press, New York (1980), S.129
- 43) VAN ROLLINS, M., HO, S.H.K., GREENWALD, J.E., ALEXANDER, M., DORMAN, N.J., WONG, L.K. und HORROCKS, L.A.: Prostaglandins 20, 571-577 (1980)
- 44) TERRAGNO, A., RYDZIK, R. und TERRAGNO, N.A.: Prostaglandins 21, 101-112 (1981)
- 45) PORTER, N.A., WOLF, R.A., YARBRO, E.M. und WEENEN, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1058-1064 (1979)
- 46) KUHL, P.: persönliche Mitteilung
- 47) KUHL, P., SHILOH, R., IHA, H., MURAWSKI, U. und ZILLIKEN, F.: Prostaglandins 28, 785-804 (1984)
- 48) PEDERSEN, U., RASMUSSEN, P.B., LAWESSON, S.O.: Liebig's Ann. Chem. 1557-1569 (1985)
- 49) HAMBERG, M. und SAMUELSSON, B.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3400-3404 (1979)
- 50) HAMBERG, M., SVENSSON, J. und SAMUELSSON, B.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3824-3828 (1974)

- 51) DICZFALUSY, U., FALARDEAU, P. und HAMMARSTROEM, S.: FEBS Letters 84, 271-274 (1977)
- 52) SIESS, W., ROTH, P., WEBER, P.C.: Thromb. Haemost. 45, 204 (1981)
- 53) KUEHL, F.A., DOUGHERTY, H.W. und HAM, E.A.: Biochem. Pharmacol. 33, 1-5 (1984)
- 54) HIGGS, G.A., FLOWER, R.J. und VANE, J.R.: Biochem. Pharmacol. 28, 1959-1961 (1979)
- 55) FESSLER, B.: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
- 56) FLOWER, R.J.: in "Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 50/I" (Hrsg. J.R. Vane, S.H. Ferreira), Springer-Verlag Heidelberg-Berlin-New York (1978), S. 394-422
- 57) GRYGLEWSKI, R.J.: in "Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 50/II" (Hrsg. J.R. Vane, S.H. Ferreira), Springer-Verlag Heidelberg-Berlin-New York (1979), S. 3-43
- 58) LANDS, W.E.M. und HANEL, A.M.: in "Prostaglandins and related Substances" (Hrsg. C. Pace-Asciak, E. Granström), Elsevier Science Publishers Amsterdam (1983), S. 203-229
- 59) EGAN, R.W. und GALE, P.H.: 6 th International Conference on Prostaglandins and related Compounds, Florenz (1986), Abstract book S. 364
- 60) LANDS, W.E.M. und HANEL, A.M.: Prostaglandins 24, 271-277 (1982)
- 61) FLOWER, R.J., CHEUNG, H.S. und CUSHMAN, D.W.: Prostaglandins 4, 325-341 (1973)
- 62) ROBAK, J., WIECKOWSKI, A. und GRYGLEWSKI, R.J.: Biochem. Pharmacol. 27, 393-396 (1978)
- 63) TAKEGUCHI, C., KOHNO, E. und SIH, C.J.: Biochemistry 10, 2327-2376 (1971)
- 64) KU, E.C. und WASVARY, J.M.: Biochim. Biophys. Acta 384, 360-368 (1975)
- 65) EGAN, R.W., GALE, P.H., BEVERIDGE, G.C., MARNETT, L.J., KUEHL, F.A. Jr.: in "Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 6" (Hrsg. B. Samuelsson, P.W. Ramwell, R. Paoletti), Raven Press, New York (1980), S. 153-155
- 66) YAMAMOTO, S.: in "Prostaglandins and related Substances" (Hrsg. C. Pace-Asciak, E. Granström), Elsevier Science Publishers Amsterdam (1983), S. 171-202
- 67) MARNETT, L.J., WLODAWER, P. und SAMUELSSON, B.: J. Biol. Chem. 250, 8510-8517 (1975)
- 68) ZENSER, T.V. und DAVIS, B.B.: in "Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism" (Hrsg. W.M. Lands), Martinus Nijhoff Publishing, Boston (1985), S. 127-149
- 69) DEGEN, G.H., METZLER, M. und SIVARAJAH, K.S.: Carcinogenesis 7, 137-142 (1986)
- 70) DEGEN, G.H., ELING, T.E. und MCLACHLAN, J.A.: Cancer Res. 42, 919-923 (1982)
- 71) POTTER, D.W. und HINSON, J.A.: J. Biol. Chem. 262, 974-980 (1987)
- 72) NUGTEREN, D.H. und HAZELHOF, E.: Biochim. Biophys. Acta 326, 448-461 (1973)

- 73) WALLACH, D.P. und DANIELS, E.G.: Biochim. Biophys. Acta 231, 445-457 (1971)
- 74) HUMES, J.L., WINTER, C.A., SADOWSKI, S.J. und KUEHL, F.A., Jr.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 2053-2056 (1981)
- 75) HOPPE, H.A.: Drogenkunde, Bd.1, Verlag Walter de Gruyter Berlin-New York (1975)
- 76) HAGERS Handbuch der pharmazeutischen Praxis (Hrsg. P.H. List, L.Hörhammer) Springer-Verlag Heidelberg-Berlin-New York (1975)
- 77) WICHTL, M. (Hrsg.): Teedrogen, Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart (1984)
- 78) BRAUN, H.: Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker, 5.Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1986)
- 79) Homöopathisches Repetitorium, Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (1985)
- 80) KÖHLER, G.: Lehrbuch der Homöopathie, Bd. II, Hippokrates Verlag Stuttgart (1986)
- 81) "Rote Liste 1987", Hrsg. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Editio Cantor, Aulendorf (1987)
- 82) DEODHAR, S.D., SETHI, R. und SRIMAL, R.C.: Ind. J. Med. Res. 71, 632-634 (1980)
- 83) SRIMAL, R.C. und DHAWAN, B.N.: J. Pharm. Pharmacol. 25, 447-452 (1973)
- 84) RASHEED, A., LAEKEMAN, G., VLIETINCK, A.J., HATFIELD, G., TOTTE, J. und HERMAN, A.G.: Planta med. 222-226 (1984)
- 85) LAEKEMAN, G., HAEMERS, A., HERMAN, A.G. und VLIETINCK, A.J.: 34 th Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Hamburg (1986) Abstract K33, S.17
- 86) YAKSH, T.L., FARB, D.H., LEEMANN, S., JESSEL, TH.M.: Science 206, 481 (1979)
- 87) ATKINSON, D.C., HICKS, R.: Agents and Actions 5, 239-249 (1975)
- 88) BONTA, I.L., NOORDHOEK, J.: Agents and Actions 3, 348-356 (1973)
- 89) BONTA, I.L.: in "Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 50/I" (Hrsg. J.R. Vane, S.H. Ferreira), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1978), S. 523-567
- 90) HÄNSEL, H., HAAS, H.: Therapie mit Phytopharmaka, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1983), S. 278-287
- 91) Berry, M.I.: The Pharmaceutical Journal 19, 611-614 (1984)
- 92) HALL, I.J., LEE, K.H., STARNES, C.O., SUMIDA, Y., WU, R.Y., WADDELL, T.G., COCHRAN, J.W. und GERHART, K.G.: J. Pharm. Sci. 68, 537-542 (1979)
- 93) HALL, I.J., STARNES, C.O., Jr., LEE, K.H. und WADDELL, T.G.: J. Pharm. Sci. 69, 537-543 (1980)
- 94) MAYER, R.A. und MAYER, M.: Pharmazie 4, 77 (1949)
- 95) STEINEGGER, E., HÖVEL, H.: Pharm. Acta Helv. 47, 222-234 (1972)
- 96) VANE, J.R.: NATURE (NEW BIOLOGY) 231, 232-235 (1971)
- 97) FLOWER, R.J. und VANE, J.R.: in "Prostaglandin Synthetase Inhibitors" (Hrsg. H.J. Robinson, J.R. Vane), Raven Press New York (1974), S. 9-18

- 98) WHITEHOUSE, M.W., RAINSFORD, K.D., ARDLIE, N.G., YOUNG, I.G. und BRUNE, K.: in "Proceedings of the Symposium on Aspirin and Related Drugs: Their Actions and Uses:" (Hrsg. K.D. Rainsford, K.Brune, M.W. Whitehouse), Birkhäuser Verlag Basel-Stuttgart (1977), S.43-57
- 99) HAMBERG, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 720-726 (1972)
- 100) MEIER, B., STICHER, O. und BETTSCHART, A.: Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 341-347 (1985)
- 101) WULFF, G.: Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 797 (1968)
- 102) VANDERHOEK, J.Y., MAKHEJA, A.N., BAILEY, J.M. (1980): Biochem. Pharmacol. 29, 3169-3173 (1980)
- 103) MAKHEJA, A.N., VANDERHOEK, J.Y., BRYANT, R.N., BAILEY, J.M.: in "Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 6" (Hrsg. B.Samuelsson, P.W. Ramwell, R. Paoletti), Raven Press, New York (1980), S. 309-312
- 104) APITZ-CASTRO, R., CABRERA, S., CRUZ, M.R., LEDEZMA, E., JAIN, M.K.: Thromb. Res. 32, 155-169 (1983)
- 105) BLOCK, E., AHMAD, S., JAIN, M.K., CRECELY, R.W., APITZ-CASTRO, R., CRUZ, M.R.: J. Am. Chem. Soc. 106, 8295-8296 (1980)
- 106) BAUER, R., WAGNER, H.: Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 1313-1321 (1983)
- 107) KREHER, B.: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
- 108) HIGGS, G.A., SALMON J.A., HENDERSON B., VANE, J.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1417-1420 (1987)
- 109) MADDAUS, G.: Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Bd. 2, G. Thieme Verlag Leipzig (1938), S. 1727-1733
- 110) HEGI, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. V, Karl Hauser Verlag München (1958)
- 111) GARCKE, A.: Illustrierte Flora, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg (1972)
- 112) HAGERS Handbuch der Pharmazeutischen Praxis (Hrsg. P.H. List, L. Hörhammer), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1973)
- 113) KLOKOVA, M.V., BEREZOVKAYA, T.P., SERYKH, E.A. und KHARKEVICH, S.S.: Khim. Prir. Soedin 6, 802-803 (1981)
- 114) MIKHAILOVA, N.S., RYBALKO, K.S. und SHEICHENKO, V.I.: Khim. Prir. Soedin 3, 322-325 (1979)
- 115) KABANOV, V.S. und ESTRATOVA, R.I.: Khim. Prir. Soedin 6, 715-718 (1978)
- 116) KLOKOVA, M.V., KHAN, V.A., DUBOVENKO, Z.V., PENTEGOVA, V.A., BEREZOVKAYA, T.P. und SERYKH, E.A.: Khim. Prir. Soedin 3, 293-296 (1983)
- 117) V. SCHANTZ, M. und HILTUNEN, R.: Sci. Pharm. 39, 137-146 (1971)
- 118) ESTRATOVA, R.I., KABANOV, V.S., KRYLOVA, I.L und PROKOSHEVA, L.I.: Khim.-Farm. Zh. 12, 71-77 (1978)
- 119) TATTJE, D.H.E. und BOS, R.: Planta med. 41, 303-307 (1981)
- 120) MIKHAILOVA, N.S. und RYBALKO, K.S.: Khim. Prir. Soedin. 2, 175-180 (1980)
- 121) BELOVA, N.V. und SHABUNEVICH, L.E.: Khim. Prir. Soedin. 3, 62 (1967)

- 122) KRUG, H. und OLECHNOWICZ-STEPIEN, W.: Dissertationes Pharm. 17, 213-219 (1965), ref. nach C.A.
- 123) MIKHAILOVA, N.S., KONOVALOVA, O.A. und RYBALKO, K.S.: Khim. Priir. Soedin 1, 127-130 (1978)
- 124) KLOKOVA, M.V., SERYKH, E.A. und BEREZOVKAYA, T.P.: Khim. Priir. Soedin 4, 517 (1984)
- 125) HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. IV, Birkhäuser Verlag Basel-Stuttgart (1966)
- 126) SCHANTZ, M.VON, WILLEN, K.G., HILTUNEN, R.: Acta Chem. Scand. 27, 551 (1973)
- 127) TSUKAMOTO, H., HISADA, S. und NISHIBE, S.: Chem. Pharm. Bull. 33, 4069-4073 (1985)
- 128) CUSSANS, N.J. und HUCKERBY, T.N.: Tetrahedron 31, 2719-2726 (1975)
- 129) BRIMACOMBE, J.S., JONES, B.D., STACEY, M., WILLARD, J.J.: Carbohydrate Res. 2, 167 (1966)
- 130) WILLIAMS, D.H., FLEMING, I.: Strukturaufklärung in der organischen Chemie, 5. Auflage, G. Thieme Verlag Stuttgart-New York (1985)
- 131) TSUKAMOTO, H., HISADA, S. und NISHIBE, S.: Chem. Pharm. Bull. 33, 396-399 (1985)
- 132) CHARI, V.M., JORDAN, M., WAGNER, H.: Planta med. 34, 93-96 (1978)
- 133) KASHIWADA, Y., NONAKA, G.I. und NISHIOKA, I.: Chem. Pharm. Bull. 34, 3237-3243 (1986)
- 134) ADEGAWA, S., MIYASE, T., UENO, A., NORO, T., KUROYANAGI, M. und FUKUSHIMA, S.: Chem. Pharm. Bull. 33, 4906-4911 (1985)
- 135) MIYASE, T., UENO, A., NORO, T., KUROYANAGI, M. und FUKUSHIMA, S.: Chem. Pharm. Bull. 33, 4451-4456 (1985)
- 136) ADEGAWA, S., MIYASE, T. und FUKUSHIMA, S.: Chem. Pharm. Bull. 34, 3769-3773 (1986)
- 137) LEE, R.E., BYKADI, G. und RITSCHER, W.A.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 31, 640-642 (1981)
- 138) NEICHI, T., KOSHIHARA, Y. und MUROTA, S.I.: Biochim. Biophys. Acta 753, 130-132 (1983)
- 139) SEKIYA, K., OKUDA, H. und ARICHI, S.: Biochim. Biophys. Acta 713, 68-72 (1982)
- 140) KIMURA, Y., OKUDA, H., ARICHI, S., BABA, K. und KOZAWA, M.: Biochim. Biophys. Acta 834, 224-229 (1985)
- 141) GILLIS, W.T.: Rhodora 73, 72/161/370/465 (1971)
- 142) MADAUS, G.: Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Bd. 3, G. Thieme Verlag Leipzig (1938), S. 2316-2323
- 143) PHARMAZEUTISCHE STOFFLISTE: 4. Auflage, (Hrsg. ABDA), Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH, Frankfurt (1979)
- 144) JOHNSON, R.A., BAER, H., KIRKPATRICK, C.H., DAWSON, C.R. und KHURANA, R.G.: J. Allergy Clin. Immunol. 49, 27-35 (1972)
- 145) MARKIEWITZ, K.H. und DAWSON, C.R.: J. Org. Chem. 30, 1610-1613 (1965)
- 146) BYERS, V.S., CASTAGNOLI, N. und EPSTEIN, W.L.: J. Clin. Invest. 64, 1449-1456 (1979)
- 147) BYERS, V.S., EPSTEIN, W.L., CASTAGNOLI, N. und BAER, H.: J. Clin. Invest. 64, 1437-1448 (1979)

- 148) ELSOHLY, M.A., BENIGNI, D.A., TORRES, L. und WATSON, E.S.: J. Pharm. Sci. 72, 792-795 (1983)
- 149) WATSON, E.S., MURPHY, J.C., WIRTH, P.W., ELSOHLY, M.A. und SKIERKOWSKI, P.: J. Pharm. Sci. 70, 785-789 (1981)
- 150) WATSON, E.S., MURPHY, J.C., WIRTH, P.W., WALLER, W.C. und ELSOHLY, M.A.: J. Invest. Dermatol. 76, 164-169 (1981)
- 151) ELSOHLY, M.A., ADAKAWAR, P.D., MA, C.Y. und TURNER, C.E.: J. Nat. Prod. 45, 532-538 (1982)
- 152) BILLETTS, S., CRAIG, J.C., CORBETT, M.D. und VICKERY, J.F.: Phytochemistry 15, 533-535 (1976)
- 153) GROSS, M., BAER, H. und FALES, H.M.: Phytochemistry 14, 2263-2266 (1975)
- 154) CRAIG, J.C., WALLER, W.C. und BILLETTS, S.: J. Pharm. Sci. 67, 483-485 (1978)
- 155) SYMES, W.F. und DAWSON, C.R.: J. Am. Chem. Soc. 76, 2959-2963 (1954)
- 156) ELSOHLY, M.A., CRAIG, J.C., WALLER, W.C. und TURNER, C.: Phytochemistry 17, 2140-2141 (1978)
- 157) KARRER, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag Basel-Stuttgart (1958)
- 158) HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 3, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart (1964)
- 159) MA, C.Y., ELSOHLY, M.A. und BAKER, J.K.: J. Chromatogr. 200, 163-169 (1980)
- 160) NISHIZAWA, M., YAMAGISHI, T. und OHYAMA, T.: Chem. Pharm. Bull. 31, 2150-2152 (1983)
- 161) BALINT, A.V., DAWSON, J.H., DAWSON, C.R.: Anal. Biochem. 66, 340-352 (1972)
- 162) SKOPP, G., OPFERKUCH, H.J. und SCHWENKER, G.: Z. Naturforsch. 42c, 7-16 (1986)
- 163) SKOPP, G.: Dissertation Universität Heidelberg (1986)
- 164) FERREIRA, S.H., VANE, J.R.: in "Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 50/II" (Hrsg. J.R. Vane, S.H. Ferreira), Springer-Verlag Heidelberg-Berlin-New York (1979), S.371
- 165) CHESON, B.D., CHRISTENSEN, R.L., SPERLING, R., KOHLER, B.E. und BABIOR, B.M.: J. Clin. Invest. 58, 789-796 (1976)
- 166) VANDERHOEK, J.Y. und LANDS, W.E.M.: Biochim. Biophys. Acta 296, 382-385 (1973)
- 167) Food and Drug Administration: Scientific Review of Eugenol and related substances in flavour usage, Washington (1978)
- 168) DREHER, R., LEITZKE, D.: 1. Phytotherapie-Kongreß, Köln (1987), Abstract-Band S. 72
- 169) SCHNEIDER, E.: Z. Phytotherapie 8, 35-37 (1987)
- 170) KLOKOVA, M.V., CHERNOVA, N.A., Pishep T.P.: Rastit. Resur. 19, 108-112 (1983)
- 171) STENHAGEN, E., ABRAHAMSSON, S., MCLAFFERTY, F.W. (Hrsg.): Registry of Mass Spectral Data, Vol. 1, New York (1974)
- 172) STEINEGGER, E. und BRANTSCHEN, A.: Pharm. Acta Helv. 33, 334-343 (1959)
- 173) TANAKA, S., TAJIMA, M., TSUKADA, M., TABATA, M.: J. Nat. Prod. 49, 466-469 (1986)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Wagner, für das überaus große Interesse an meiner Arbeit und deren stets großzügige Förderung danken.

Weiterhin möchte ich danken:

Frau Dr. G.H. Degen, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, für Ihr äußerst kollegiales Engagement, die Gelegenheit zu Aufenthalten und Experimenten in ihrem Labor und ihre konstruktiven Diskussionsbeiträge.

Der Fa. Nattermann, Köln, und Herrn Dr. Peter Kuhl, Abt. Biochemische Forschung, Fa. Nattermann für die Mithilfe beim Aufbau des Prostaglandinsynthasetests.

Herrn Dr. O. Seligmann und seinen Mitarbeiterinnen für die Durchführung fast aller spektroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit und seine hilfreichen Diskussionsbeiträge.

Herrn Dr. A. Neszmelyi, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest, für die Aufnahme einiger NMR-Spektren sowie wertvolle Diskussionsbeiträge.

Herrn Ing. H. Dirks, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für die Aufnahme eines hochauflösten FAB-Massenspektrums.

Herrn R. Stadler, Institut für Pharmazeutische Biologie, Lehrstuhl Prof. Dr. M.H. Zenk, für die Aufnahme eines ^{13}C -NMR-Spektrums.

Herrn Dr. med habil. W. Dorsch, Kinderpoliklinik der Universität München, und Frau Höckmeier für die Durchführung der Radioimmunoassays.

Herrn Dr. P. Wolff für seine bewährte organisatorische Unterstützung.

Herrn Dr. G. Heubl, Botan. Institut der Universität München, für die botanische Bestimmung der Toxicodendron-Drogenmuster.

Herrn Prof. Dr. O. Sticher und Herrn Dr. B. Meier, Zürich, Herrn Prof. M.A. El Sohly, Mississippi, Herrn Prof. E. Haslam, Sheffield, Herrn Prof. E. Rodriguez, Irvine, Herrn Prof. T. Okuda, Okayama, Herrn Prof. D. Ferreira, Bloemfontein, Herrn Dr. P.B. Rasmussen, Aarhus, Herrn Dr. M. Verve, Gent, und Herrn R. Bos, Groningen für die Überlassung von Referenz- oder Testsubstanzen.

Allen genannten Firmen, die uns Drogenmaterial, Extrakte oder Reinsubstanzen zur Untersuchung überlassen haben.

Ganz herzlicher Dank gilt auch den Damen I. Gügel, R. Meyer und S. Vollmer für ihre sorgfältige technische Assistenz bei der Durchführung der biologischen Tests.

Den zahlreichen nicht genannten Kollegen und Institutsmitarbeitern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Dagmar für ihre Mithilfe und ihr großes Verständnis.

Lebenslauf

M i c h a e l Karl-Friedrich Georg W i e r e r

geb. am 9.8.1960 in Seesen/Harz

Familienstand: seit 22.6.1984 verheiratet
mit Dagmar Wierer geb. Bauer, Apothekerin

Eltern: Heinz Wierer, Postbeamter und
Henny Wierer, geb. Fahlbusch, Angestellte

Schulbesuch: 1967-1971 Gerhart-Hauptmann-Volksschule,
Bad Harzburg
1971 Werner-von-Siemens-Gymnasium,
Bad Harzburg
1971-1979 Justus-Liebig-Schule, Gymnasium
für Jungen, Darmstadt
dort 17.12.1979 Abitur

Wehrdienst: 1.1.1980 Eintritt in die Bundeswehr als
Sanitätsoffizieranwärter

Studium der
Pharmazie: SS 1980-SS 1983 an der Ludwig-Maximilians-
Universität, München
2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
28.10.1983

Pharmaziepraktikum: Nov.1983-Okt.1984, Dante-Apotheke, München
3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
29.11.1984

Approbation: 11.12.1984

Wissenschaftliche
Tätigkeit: Jan. 1985 Beginn der vorliegenden Arbeit
unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am
Institut für Pharmazeutische Biologie der
Universität München

Studium der
Lebensmittelchemie: SS 1985-WS 1987 an der Ludwig-Maximilians-
Universität, München
1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
4.12.1987

